## 炭疽病耐病性イチゴ品種 'いちご中間母本農2号' における耐病性機構に関する研究

### 生井 潔

### 目 次

要冒	•••••••••••••••••••••••••••••••••••••••
第1章	諸言 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・2
第2章	'農2号'における炭疽病耐病性関連要因の解析
1	序論 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
2	耐病性品種と感受性品種間の葉における斑点型病斑の差異 ・・・・・・・・・・・・・・・4
3	順化が '農 2 号'無菌培養個体の炭疽病耐病性に与える影響 ・・・・・・・・・・6
4	考察 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
第3章	イチゴにおける防御応答遺伝子の発現解析
1	序論 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
2	防御応答への関与が予想される遺伝子の選抜 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・10
3	防御応答シグナル物質処理が推定防御応答遺伝子の発現に与える影響 ・・・・・・13
4	炭疽病菌接種後の経時的な防御応答遺伝子の発現解析 ・・・・・・・・・・・・・15
5	順化期間の違いが推定防御応答遺伝子の発現に与える影響 ・・・・・・・・・・・17
6	考察 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・19
第4章	無菌培養 '農2号'の順化による耐病性向上に関与する遺伝子の検索
1	序論 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・23
2	材料および方法 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・23
3	結果 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
4	考察 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・37
第5章	遺伝子発現抑制を用いたイチゴにおける遺伝子機能解析法の検討
1	序論 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
2	アグロインフィルトレーションによる遺伝子機能解析法の検討 ・・・・・・・・・41
3	SMYEV ベクターの構築 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
4	SMYEV ベクターへの PDS 遺伝子の導入と大腸菌における安定性確認 ・・・・・・51
5	考察 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・54
第6章	総合考察 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・57
謝辞	
引用文献	紙 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・61
別表 1	
別表 2	
略語一見	覧 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・

(2014.1.8 受理)

### 要旨

イチゴ炭疽病耐病性品種 'いちご中間母本農2号'(以下,'農2号')と感受性品種 'とちおとめ'に炭疽病菌を接種 し,葉身における斑点型病斑の形成状況を観察した. '農2号'の斑点型病斑の平均直径は0.60 mm でほとんど経時的 な変化は無かったが, 'とちおとめ'の病斑は接種2日後の0.67 mm から9日後には2.01 mm と拡大した. また, '農2 号'の各病斑の直径は比較的一定であるのに対し, 'とちおとめ'は病斑によって著しく大きさが異なった. これらの結 果から, '農2号'の防御応答は 'とちおとめ'より早く,より安定していると示唆された. そこで,遺伝子発現レベル で '農2号'の防御応答の早さを確認するため,既知の防御応答遺伝子の発現パターンを解析した.

栃木農試で蓄積したイチゴ EST クローン(非重複 7,399 クローン)の中から,BLASTX 検索により既知の防御応答に 関連すると推定される 10 遺伝子 13 クローンを選抜した.その中で、サリチル酸(SA)処理で Thaumatin-like protein 遺 伝子と推定されたクローンの、ジャスモン酸メチル処理では Lipoxygenase 遺伝子と推定されるクローンの発現が大きく 上昇したため、両応答経路のマーカー遺伝子とした.次に'農 2 号'と'とちおとめ'に炭疽病菌を接種し、経時的に それぞれのマーカー遺伝子の発現パターンを解析した. Lipoxygenase 遺伝子の発現は、若干の上昇傾向を示したが有意 差は認められなかった.また Thaumatin-like protein 遺伝子の発現は、上昇傾向を示し一部の処理で有意差が認められた が、SA 処理時のような大きな発現上昇は示さなかったため、耐病性に対する寄与率は低いと推察された.これらの結 果から、'農 2 号'の防御応答の早さを遺伝子発現レベルで明らかにする試みは達成できなかった.

耐病性の'農2号'は通常枯死しないが、無菌培養個体は枯死する.そこで、'農2号'および'とちおとめ'の無菌 培養個体と、それぞれを3,9,15日順化した個体に炭疽病菌を接種し、経時的に発病調査を行った.その結果、'とち おとめ'は順化の有無に関わらず20日後には全個体が枯死したが、'農2号'は順化期間が長いほど発病度が低下し、 耐病性が徐々に向上した.そのため、'農2号'と'とちおとめ'を順化した時に異なる発現パターンを示す'農2号' 特異的発現遺伝子の中に、'農2号'の順化による耐病性向上に関連する遺伝子が含まれると考えられた.

そこで、栃木農試で作製したイチゴ cDNA マイクロアレイ(非重複 8,056 クローン)を用い、順化による '農 2 号' 特異的発現遺伝子を検索した.その結果、'農 2 号'特異的に発現上昇する 31 クローンと、特異的に発現低下する 20 クローンが選抜された.これらのクローンはリアルタイム RT-PCR で解析し、'農 2 号'順化個体の遺伝子発現が他の処 理に比べて有意に高い5クローンと、有意に低い1クローンを選抜した.遺伝子発現が特異的に高い5クローンのうち 4 クローンは、フラボノイド生合成経路に関連すると推定される遺伝子であった.そこで、フラボノイド生合成に関連 する他の酵素遺伝子が、マイクロアレイにスポットされているかどうか確認した.その結果、リアルタイム RT-PCR で 選抜された遺伝子も含め、13 酵素 23 クローンがスポットされていた.改めてそれらのクローンのアレイ解析結果を再 検証したところ、順化することによって概ね上昇し、'とちおとめ'に比べ'農 2 号'でより高く上昇する傾向が認めら れた.さらに、フラボノイド生合成に関与すると推定される4 クローンのリアルタイム RT-PCR の結果から、'農 2 号' 順化時のフラボノイド生合成経路の活性化が、通常栽培のイチゴ個体においても持続していることが示唆された.これ らの結果から、'農 2 号'の順化による耐病性向上にはフラボノイド生合成経路の関連が示唆された.

これら遺伝子群と炭疽病耐病性の関連性を検討するためには、効率的な遺伝子機能解析法の確立が不可欠である. そ こで、植物体から切り離した葉柄を用いたアグロインフィルトレーションによる遺伝子発現抑制を試みた. 機能解析を 行うためには、ターゲット遺伝子を発現抑制した葉柄における耐病性検定が必要とされるため、葉柄による炭疽病耐病 性検定法を確立した. しかし、葉柄を用いたアグロインフィルトレーション自体が困難と判断された. そこで、次の効 率的な遺伝子機能解析法として、SMYEV ベクターによる遺伝子発現抑制を検討した. 供試した SMYEV ベクターは、 大腸菌内での増殖時に特定の一部配列が脱落することが明らかとなったため、3 種類の異なる構造のベクターを構築し た. その結果、3 種類のベクターとも大腸菌内での安定性は向上したと考えられ、特にそのうちの 2 種類のベクターの 脱落は、全く認められなかった. またそれら 2 種類は、303 bp の PDS 遺伝子断片を挿入しても安定性に変化は見られな かった.

### 第1章 緒言

栃木県におけるイチゴは野菜の最重要品目と位置付け られ、県下一丸となって振興が図られている、平成 22 年の栃木県におけるイチゴの生産額は、249 億円(平成 22 年農林水産統計)で16 年連続日本一となり、生産か ら流通とそれに関わる様々な分野の多くの人々の努力の 賜物と言える. その大きな礎となったのが、栃木県で育 成されたイチゴ品種'女峰'(赤木ら,1985)および'と ちおとめ'(石原ら,1996)と考えられる. '女峰'は、'と よのか'(本多ら、1985)と共に2大品種時代を築き、'と ちおとめ'は直近7年間の作付面積が連続日本一という 事実から、優れた品種であることがうかがえる、一方で 栃木県では、'女峰'の作付け拡大に伴って炭疽病(原因 菌: Glomerella cingulata, アナモルフ世代: Colletotrichum gloeosporioides)の発生が問題となり(橋田ら, 1988), 'と ちおとめ'の導入に伴ってさらに萎黄病(原因菌: Fusarium oxysporum f. sp. fragariae)の発生が問題となっ た経緯がある. そのため耐病性育種は、栃木県における 重要な育種目標となっており,平成23年に品種登録申請 された'栃木 i27 号'は、'とちおとめ'と比較して両病 害に強い.しかし、耐病性の程度はそれほど強くないと 見積もられているため、更なる耐病性の改良が求められ ている.

イチゴ栽培種 (Fragaria × ananassa) はバラ科 (Rosaseae) の多年草で, F. chiloensis と F. virginiana の交雑種と推定 されている (Darrow, 1966; 國久, 2008). その上, 8 倍体 (2n=8x=56)という高次倍数性とランナーによる栄養繁 殖性という特性から、遺伝的に固定されていない複雑な ゲノム構造であることが予想される. そのため, 育種や DNA マーカーの開発を進める上で、遺伝様式を知ること は非常に重要である. Lerceteau-Köhler ら (2003) は, AFLP マーカーのマッピングから完全な disomic でも polysomic でもなく中間的であるとし、國久(2008)は CAPS マーカーの分離から高度に複二倍体化していると 推定している.また,減数分裂における染色体対合では, 約70%の細胞で28本の2価染色体が観察されたが、残 りの細胞では一部の染色体において多価染色体が観察さ れた(木庭ら,2007).これらは各結果により程度の差は あるものの,完全ではないがイチゴが2倍体的な遺伝を していることを示しており,マーカー育種が可能である ことを示唆している.

イチゴのゲノムサイズは、フローサイトメトリーによ り品種 '宝交早生'が 2C = 578 Mb, 'とよのか'が 2C = 605 Mb と推定されている (秋山ら, 2000). 1C のゲノム サイズで比較すると、シロイヌナズナの 1C = 125 Mb (AGI, 2000) よりは大きいものの、イネの 1C = 389 Mb (IRGSP, 2005) より小さい. イチゴは遺伝的に未固定で あるため、2C でゲノムサイズを論じる必要があるが、現 在のシーケンス能力からすれば十分に小さいと言える. また、F. ananassa の祖先種の 1 つと考えられている F. vesca ゲノムのドラフト配列情報が公開された (Shulaev et al., 2011). さらに、GDR (http://www.rosaceae.org/) か らイチゴの EST 配列を利用した推定 Unigene 情報や、2 倍体野生種の連鎖地図 (F. vesca× F. nubicola) が公開さ れており、他のバラ科植物を含めたゲノム情報と遺伝情 報を統合した web-database ができている (Jung et al., 2008).シロイヌナズナやイネ等のモデル植物には及ばな いが、イチゴにおいてもゲノム情報を利用できる状況が 整いつつある.

G. cingulata によって引き起こされる炭疽病は、萎黄病、 うどんこ病(原因菌: Sphaerotheca aphanis var. aphanis) とともに日本のイチゴ栽培における重要病害の1つであ る. 育苗時の発病により苗不足を引き起こし、潜在感染 した苗が定植されることによって本圃で萎凋枯死して大 きな被害をもたらす(橋田ら,1988;石川ら,1989a;手塚・ 牧野,1989). これまで,薬剤防除法や耕種的防除法(手 塚·牧野, 1989; 石川ら, 1989b; 岡山, 1989; 石川ら, 1990; 石川ら, 1993; 岡山, 1994; 石川ら, 1996; 米本ら, 2008) および病原菌検出法や病原性の検定方法等(岡山,1993; Ishikawa, 2003; 岡山ら, 2007; 鈴木ら, 2008; 平山ら, 2008a;田中ら,2009;鈴木ら,2010)が種々検討され、被 害を軽減するための技術確立が図られてきた.しかし、 依然として G. cingulata による炭疽病は、イチゴ栽培にお ける重要病害である.加えて、以前から発生が認められ ていたベノミル耐性菌 (手塚・牧野, 1989) 以外に, 近年, 他の薬剤に対する耐性菌も出現している(稲田ら,2008; 平山ら,2008b;稲田ら,2009). その上,消費者の食への 安全・安心志向や、農薬使用による環境負荷への懸念も 取りざたされている状況を考慮すると, 耐病性品種の導 入は非常に有効な対策と考えられる.

現在,日本で栽培されている主要品種は炭疽病感受性 であり,生産現場からも耐病性品種の育成が望まれてい る.一方で,イチゴは果実品質が最優先されるため,育 成された耐病性品種 'サンチーゴ'(森ら,2000)の普及 が進まないという現状もある.耐病性品種を実際の栽培 に導入するためには,果実品質の優れた耐病性品種の開 発が鍵を握っている.近年,新たな耐病性品種が育成さ れたため(森・北村,2008;沖村ら,2008),それらの品種 の普及状況に興味が持たれる.

日本における主要な栽培品種は、ランナーによる栄養 繁殖によって苗の増殖が行われるため、苗が生産者に届 くまでに長い年月を必要とし、当然ながら病害に対する リスクは高まる、栃木県では、農業試験場が育成した原々 苗を全農で1年間増殖し、その後各地の無病苗増殖基地 で1年間増殖した苗が生産者に配布される. 生産者は, 一部を採苗するための親株として,残りは栽培用の苗と して使用している.現在の栽培体系の病害リスクや長い 苗増殖期間を改善するためには, 種子繁殖性イチゴ品種 が有効と考えられる.近年,種子繁殖性イチゴの研究が 活発になり、F1品種である '千葉 F-1 号'(石川ら、2008) が育成された.しかし現段階では,種子繁殖性品種でラ ンナー増殖性品種と同等の果実品質を確保するのは難し いと思われる.一方で、ゲノム研究を行うには遺伝的に 固定された品種が望ましく, 効率的な育種を可能にする という観点からも、将来的には非常に有望と考えられる.

現在は、交配を行って得られた多数のF1個体から優れ た個体を選抜し、新品種を作出する育種法が主流となっ ている. 交配により優良個体が作出できれば、そのまま 新品種になるというメリットがある一方で、自殖性作物 のように戻し交配によって優良品種に耐病性のみを導入 した同質系統を作出するという育種法は望めない.しか し DNA マーカーが開発できれば、耐病性を保持しつつ 繰り返し交配して、果実形質を改良することは可能とな る. そのため栃木県においても、炭疽病および萎黄病耐 病性に連鎖する DNA マーカーの開発を行っている. 萎 黄病耐病性は主働遺伝子の存在が示唆されているが、炭 疽病耐病性は複数遺伝子に支配されていると推測されて いる (Mori et al., 2005; 森, 2001). そのため, 萎黄病耐 病性に連鎖する DNA マーカーの開発は比較的容易と推 察され,既に報告もある(飯村ら,2011;橋本ら,2011). 一方,炭疽病耐病性の DNA マーカーは,複数の QTL マ ーカーを開発する必要があり,そのマーカーの汎用性も 低いことが予想されるため、効率的な育種技術を確立す るためにはDNAマーカーだけでは不十分と考えられる. また、複数の量的な耐病性遺伝子の存在は、多くの要因 が複合的に関与する複雑な耐病性機構を予想させ、解明 するためには様々な視点からの解析が必要と考えられる. 炭疽病耐病性に関与する遺伝子を同定し, 耐病性機構を 解明することが育種の効率化を可能にし、有効な防除法 の開発にもつながるであろう.

G. cingulata に対する耐病性遺伝子に関する知見は少 ない. その理由として, 前述したように耐病性が複数遺 伝子に支配されていると推測されていることや、国外で はもう1つの原因菌 C. acutatum による炭疽病の発生が主 流であることが挙げられる. C. acutatum に対する耐病性 については、病原性グループ2の菌株に対する単因子優 性の抵抗性遺伝子 Rca2 と量的形質の中間的な耐病性が 存在し、Rca2 に連鎖する DNA マーカーが開発されてい る (Denoyes-Rothan et al., 2005; Leercetea-Köhler et al., 2005).また,中間的な耐病性品種と感受性品種との間で, 炭疽病菌接種後の遺伝子発現解析が行われており, Chitinase や PR-5, PR-10 等の PR タンパク質と相同性の ある遺伝子が、感受性品種と比較して耐病性品種でより 早く、より強く発現上昇している (Casado-Díaza et al., 2006). G. cingulata と C. acutatum の病徴は異なるが, 両 菌とも付着器を形成して組織に侵入するため、C. acutatum の中間的な耐病性の防御応答については、G. cingulata に対する耐病性と共通点があると思われる.

"いちご中間母本農2号"(以下'農2号')は、耐病 性品種・系統間での交配から得られたため、自殖実生集 団で強度耐病性個体の出現頻度が高い(沖村ら,2004). そのため、耐病性の遺伝解析やメカニズム解明には優れ た材料と考えられる.そこで本研究では、イチゴ炭疽病 耐病性品種である (農2号)と感受性品種である 'とち おとめ'を材料とし、分子生物的なアプローチで耐病性 メカニズムを解明することを目的とした.まず、'農2 号'と'とちおとめ'を比較し、耐病性に関する表現形 質の違いについて明らかにした. 葉身における斑点型病 斑の形成状況から、'農2号'は'とちおとめ'と比較し て防御応答が速いため、それが耐病性を示す要因の1つ と推察された.そこで、既知の防御応答遺伝子について、 炭疽病接種後の発現解析を行った.また、耐病性である

・農2号、を無菌培養すると感受性を示し、順化する過程で耐病性が向上した.一方で感受性の、とちおとめ、は、順化による耐病性の向上が認められなかった.そこで、、農2号、の順化による耐病性向上に関わる遺伝子の検索を行うため、cDNAマイクロアレイを用いて、農2号、の順化により特異的に変動する遺伝子を選抜した.さらに、選抜された遺伝子の機能を明らかにするために、遺伝子発現抑制による機能解析法の確立も試みた.

### 第2章 '農2号'における炭疽病 耐病性関連要因の解析

### 1 序論

炭疽病感受性品種 'とちおとめ'に炭疽病菌 (G. cingulata)を接種すると、葉身では斑点型病斑を形成、 葉柄では陥没病斑を形成 (図 2-1) して葉柄折損を起こ し、クラウン部に感染すると萎凋・枯死する.一方、耐 病性品種の '農2号'は炭疽病菌を接種しても通常枯死 しない.しかし、斑点型病斑が形成されるため、侵入し た菌糸を過敏感反応で封じ込めていると考えられる.同 様に、感受性の 'とちおとめ'においても、葉身では斑 点型病斑を形成するが分生子層の形成は通常認められな いため、抵抗性反応を示していると推察される.ただし、

・農2号、と、とちおとめ、の斑点型病斑を比較すると 明らかに形成状況が異なるため、葉上に形成される斑点 型病斑を経時的に観察して品種間差を検討した。

遺伝子発現解析を行う場合,供試植物材料は環境要因 や微生物の影響をできるだけ低減することが望ましい. そこで,その条件に最も近いのが無菌培養苗と考え,炭 疽病菌を接種した.ところが,耐病性であるはずの'農 2号'が全て枯死したため,無菌状態では耐病性を十分 に発現していないと考えられた.ランナー苗では通常枯 死することはなく,これまでの経験から順化苗でも枯死 することはなかった.そこで,無菌植物の順化期間と耐 病性の関連性について検証した.

### 2 耐病性品種と感受性品種の葉における 斑点型病斑形成の差異

### 2-1 材料および方法

### 2-1-1 供試植物

イチゴ品種は、炭疽病耐病性の'農 2 号'および感受性 の'とちおとめ'を供試した.採取したランナーは、くん 炭・鹿沼土(1:2)を詰めた10.5 cm 黒ポリポットに挿 し芽した(以下、ランナー苗).ランナー苗は、ガラス温 室内で88日間育苗した.施肥は、挿し芽2週間後に、ス ーパータブレット50RT(中粒)(オーケー産業)をポッ ト当たり1粒ずつ置いた.灌水はドリップで行った.

#### 2-1-2 供試病原菌

イチゴ炭疽病菌は、2002 年栃木県大田原市でイチゴ品 種・とちおとめ、発病株から分離された G. cingulata OTT512 菌株を供試した.供試菌は、ポテトデキストロ ース寒天培地(Difco)で25℃・暗黒条件で10~14日間 培養した.培地上に形成された分生子は滅菌純水を加え て回収し、滅菌した二重ガーゼで濾過した.得られた分 生子懸濁液は1×10<sup>5</sup>個/ml に調整した(以下,接種源).

#### 2-1-3 病原菌接種

イチゴ炭疽病菌の接種は、ペーパークロマトグラフ用 噴霧器を用いて供試植物1個体あたり接種源3mlを噴霧 した.ランナー苗は接種後ポリエチレン袋に入れ、28℃・ 14時間日長のインキュベーターで管理した.ポリエチレ ン袋は24時間後に外し,引き続きインキュベーターで管 理した.灌水は適宜、底面給水を行った.

### 2-1-4 病斑直径の調査

病斑直径は炭疽病菌接種 2, 3, 6, 9日後に調査した. 葉上に形成された病斑を,若い葉から順番に各個体 20



図 2-1 感受性品種 'とちおとめ'における炭疽病菌接種による病徴 a は葉身の斑点型病斑.b は葉柄の陥没病斑

я

ずつ計測し、下記の計算式で平均病斑直径および標準偏 差を算出した.ただし、認められた病斑数が20以下の場 合は、全病斑を計測した(表2-1).計測には1mm目盛 の定規を用い、0.5mm刻みで直径を測定した.なお、各 品種とも5個体ずつ供試した.

平均病斑直径=Σ各病斑の直径/供試病斑数

標準偏差=√ {∑(個体ごとの平均病斑直径-平均病斑 直径)<sup>2</sup>/(供試個体数-1)}

表 2-1 供試個体ごとの病斑直径測定に供試した病斑数

品種	個体	固体供試病斑数					
	番号	2日後	3日後	6日後	9日後		
とちおとめ	1	9	18	20	20		
	2	14	20	20	20		
	3	19	20	20	20		
	4	11	20	20	20		
	5	7	8	20	20		
農2号	$1 \sim 5$	20	20	20	20		

網掛けした部分は、病斑が20個以上認められた.



### 2-2 結果

・農2号、および、とちおとめ、に炭疽病菌を接種し、 葉身における斑点型病斑の形成状況を観察した.接種し た次の日は、供試した全個体で病斑の形成は認められな かった.接種2日後には、、農2号、の全供試個体で20 病斑以上形成された.一方、とちおとめ、では、接種2 日後の各供試個体において7~19病斑、3日後の2個体 が8病斑および18病斑と20病斑に満たなかった.つま り、、とちおとめ、では接種3日後以降まで徐々に病斑数 が増加し、病斑によって形成されるまでの時間が異なる ことが示唆された.また接種3日後の、とちおとめ、で、 20病斑以上形成されている個体と、8病斑しか形成され ていない個体があり、病斑が形成される早さに個体間差 が認められた.(表2-1).

・農2号'の平均病斑直径は,接種2日後の0.60 mm から9日後の0.61 mmとほとんど変化がなかった. 'と ちおとめ'の平均病斑直径は,接種2日後の0.67 mm か ら3日後に0.96 mm,6日後に1.93 mm,9日後に2.01 mm と拡大した. '農2号'における平均病斑直径の標準偏差

> は 0.197~0.231 であったが、'とちおとめ'は 0.354~0.740 と大きかった(図 2-2,図 2-3). 接 種 9 日後に計測した'農 2 号'の病斑直径は 0.5 ~1.5 mm の範囲だったのに対し,'とちおとめ' は 0.5~4.0 mm と病斑によって大きさが大きく 異なった.

両品種とも5個体ずつ供試した.病斑が20個以上形成されていた個体は20病斑を計測し, それ以下の個体は全病斑を計測した.エラーバーは標準偏差を示す.



図 2-3 炭疽病菌接種により形成される葉の斑点型病斑 炭疽病菌接種9日後に撮影した.a: '農2号'の病斑.b: 'とちおとめ'の病斑.矢印は病斑を示す. バーは2mmを示す.

### 3 順化が '農 2 号' 無菌培養個体の炭疽病 耐病性に与える影響

### 3-1 材料および方法

### 3-1-1 供試植物

イチゴ品種は、炭疽病耐病性の '農2号' および感受 性の 'とちおとめ'を供試した. 両供試品種は、ランナ 一生長点を用いて多芽体増殖し、無菌培養植物を作製し た. 200 ml 培養ビンにニッピ良菜培土 SP200 (N: 200 µg/ml, P: 2500 µg/ml, K: 200 µg/ml, Mg: 200 µg/ml, pH 6 -6.5:全国農業協同組合連合会)を約 50 ml 詰めて滅菌し、 無菌培養植物を移植して 20℃・12 時間日長で培養した. また、移植してから実験に供試するまでの日数を移植後 日数として記載した.本実験の供試植物は、'農2号'お よび 'とちおとめ'無菌培養個体 (移植後 65 日)を用い た.

#### 3-1-2 順化

順化は,供試植物の培養ビンのフタを取り除いて 22℃・14時間日長のインキュベーターで,それぞれ3日, 9日または15日間管理した.対照は無菌培養個体とした. なお,各供試個体に炭疽病菌を同時に接種するため,移 植65日後に順化15日個体を順化し,その6日後に順化 9日個体,さらに6日後に順化3日個体を順化した.無 菌培養個体は順化3日個体順化後,さらに3日間培養し た.灌水は,ハンドスプレーを用いて水道水を適宜噴霧 した.

#### 3-1-3 病原菌接種

イチゴ炭疽病菌の接種は、各順化処理個体および無菌 培養個体を供試し、ペーパークロマトグラフ用噴霧器を 用いて1個体あたり接種源1mlを噴霧した(図2-4).そ の後、フタをして密封し25℃・14時間日長のインキュベ ーターで管理した、フタは接種24時間後に取り除いた.

#### 3-1-3 発病調査

発病調査は発病指数 0: 無病徴, 1: 斑点型病斑を形成, 2: 葉柄に陥没病斑を形成または植物体の一部が萎凋, 3: 全身萎凋, 4: 枯死の基準(図 2-5) で行い,下記の計算 式で発病度を算出した.なお,各処理とも5個体ずつ供 試し,接種 6,13,20,27,34日後に調査した.実験は 15日間順化処理を2回,その他の処理を3回繰り返した. 得られた発病指数から下記の計算式で逆正弦変換を行っ て発病度を算出した後,更に各処理の平均発病度および 標準誤差を算出し,Tukeyによる多重検定を行った.ま た,各順化期間の調査日ごとの'農2号'と'とちおと め'間において,t検定を行った.

発病度=逆正弦変換 {Σ(各発病指数×その発病指数の 個体数)/(4×調査個体数)}

平均発病度=Σ各反復の発病度/実験反復回数 標準誤差=√{Σ(各反復の発病度-平均発病度)2/(実 験反復回数-1)}/√実験反復回数



### 図 2-4 培養ビンで順化したイチゴ個体の炭疽病 菌接種直後の状態

a: '農2号'(左)と'とちおとめ'(右)を横から撮 影した.b: '農2号'を上から撮影した.c: 'とちお とめ'を上から撮影した.

b







図 2-5 培養ビンで順化したイチゴ個体への G. cingulata 接種による発病状況 a:発病指数1(斑点型病斑を形成).b:発病指数2(葉柄に陥没病斑を形成または植物体の 一部が萎凋).c:発病指数3(全身萎凋).d:発病指数4(枯死)

### 3-2 結果

(農2号) および 'とちおとめ'の無菌培養個体と、 それぞれ3、9、15日順化した個体に炭疽病菌を接種し、 経時的に発病状況を調査した. '農2号'の炭疽病菌接種 6日後は、全ての処理で平均発病度が25であった. しか し、接種13日後以降は、順化期間が長いほど低い発病度 を示し、接種34日後には順化3、9、15日個体の発病度 がそれぞれ90、75.5、55.8、39.2 となった. 接種後日数 ごとの発病度についてTukeyの多重検定を行ったところ、 順化3日個体の発病度は、無菌培養個体に対し接種13 日後、20日後および27日後で有意に(P<0.05)低かっ た. また、順化9および15日個体の発病度は、無菌培養 個体に対し接種13日後以降全ての調査日において有意 に低かった(図2-6a).一方 'とちおとめ'は、接種6 日後および13日後で有意差が認められたが、接種20日 後には全供試個体が枯死した(図2-6b).

・農2号、と、とちおとめ、の無菌培養個体を比較す ると、接種6日後の発病度はそれぞれ29.9、39.2、接種 13日後は58.9、81.4となり、、農2号、が有意に低く推 移した. 接種20日後の発病度は、農2号、85.7、、とち おとめ、90.0となり、それ以降の差は認められなかった. また、順化期間が長くなるにつれ、、農2号、と、とちお とめ、の平均発病度の差は大きくなる傾向が認められた (表2-2).

### 4 考察

### 4-1 斑点型病斑形成から推定する防御応答の早さと 耐病性との関連

イチゴ炭疽病菌 G. cingulata は、耐病性品種 '農2号' および感受性品種 'とちおとめ' のどちらにも葉身に斑 点型病斑を形成する.斑点型病斑は、ある一定段階で伸 長が止まり胞子形成を伴わないため抵抗性反応と考えら れ、両品種とも葉では抵抗性反応を示していると考えら れる.しかし、斑点型病斑の形成状況を観察すると、'と ちおとめ'は'農2号'と比較して病斑形成が遅い傾向 を示した. 両供試品種とも最初に病斑が観察されたのは 接種2日後であったが、 'とちおとめ' では時間が経過し てから形成される病斑が認められ、病斑によって形成さ れる早さが異なった. さらに病斑数が増加するスピード に個体間差が認められた(表 2-1).また平均病斑直径の 比較では、'とちおとめ'は徐々に病斑が拡大したのに対 し、 (農2号) の病斑は一定の大きさであった (図2-2). 接種6日後の'農2号'の病斑直径は, 0.5~1.5 mm と 小さく早い段階で炭疽病菌を封じ込めている.しかし, 'とちおとめ'では0.5~4.0 mmと病斑によって大きさ が異なるため、早く封じ込められた病斑と封じ込めが遅 れて,ある程度拡大させてしまった病斑があると推察さ れた.この結果から、葉身における'農2号'の防御応 答は、'とちおとめ' より早く、より安定している、もし



### 図 2-6 順化期間が無菌培養植物の炭疽病耐病性に与える影響

a: '農2号'の平均発病度の推移.b: 'とちおとめ'の平均発病度の推移.順化なしは無菌培養個体に,順化3日,順化9日,順化15日は,無菌培養個体をそれぞれの期間順化した個体に,炭疽病菌を接種した.各処理とも5個体ずつ供試し,順化15日は2反復,それ以外の処理は3反復繰り返した.発病度は逆正弦変換した値を用いた.エラーバーは標準誤差を示す.各接種後日数の同じアルファベットは,Tukeyの多重検定により有意差(P<0.05)が認められないことを示す.

順化	品種名		接種後日	数ごとの平均	勾発病度	
期間		6日	13日	20日	27日	34日
なし	農2号	29.9	58.9	85.7	90.0	90.0
	とちおとめ	39.2 *	81.4 *	90.0	90.0	90.0
3日	農2号	30.0	40.2	58.0	68.1	75.7
	とちおとめ	33.2	73.4 **	90.0 *	90.0 *	90.0
9日	農2号	30.0	33.1	44.0	52.8	55.8
	とちおとめ	43.1 **	63.5 **	90.0 **	90.0 **	90.0 **
15日	農2号	30.0	33.2	33.2	37.8	39.2
	とちおとめ	42.1	67.2	90.0	90.0 *	90.0

表 2-2 各順化期間における '農 2 号' と'とちおとめ' 間の発病度比較

発病度は逆正弦変換した値を用いた.\*は各順化期間の各調査日の'農2号'と'とちおとめ'間のt検定で,5%水準で有意差があること示す.\*\*は同様に,1%水準で有意差があることを示す.

くはより早いことが安定をもたらしていると示唆される. イネいもち病(原因菌: Magnaporthe grisea)の真性抵 抗性は,病斑のタイプにより抵抗力の強弱が規定され, 特に抵抗性に分類されるものは,病斑が小さいほど抵抗 力が強いとされている.また,真性抵抗性は葉いもちに 対する抵抗性で分類されたもので、穂いもちの方が若干 罹病的に偏っている(山中・山口,1987). すなわち、葉 いもちで(比較的弱い)抵抗性と判定される品種が、穂 いもちで胞子形成可能な病斑を形成する.同様のことが、 イチゴの葉身と葉柄・クラウンの関係にも当てはまる.

・農2号、は葉身と同様に葉柄でも斑点型病斑で炭疽病 菌を封じ込めるが、'とちおとめ'は進展型の病斑が形成 されて葉柄折損を起こしてその葉柄・葉身を枯らすため, 葉身より顕著な発病差が認められる. 同様にクラウンに 炭疽病菌が感染すると、 とちおとめ' はクラウン部が褐 変し枯死に至るが、'農2号'は通常クラウン部が褐変し たり枯死したりしない. つまり、'とちおとめ' は葉身で 耐病性であるが、葉柄、クラウンでは胞子形成可能な病 斑を形成し感受性である. イネいもち病の真性抵抗性は 主動遺伝子による質的抵抗性であり, イチゴ炭疽病耐病 性は複数の遺伝子が関与した量的抵抗性という違いはあ るが、過敏感反応により侵入した菌糸を封じ込める防御 応答に関して共通性が認められる。(農2号)の防御応答 の早さは、葉身における斑点型病斑による炭疽病菌封じ 込めの早さ(葉身での強い耐病性)に貢献しているだけ でなく、植物体全体における耐病性の1つの重要な要因 と推察された. そこで,防御応答の早さを遺伝子発現レ ベルで確認することを考えた.

### 4-2 '農 2 号'無菌培養個体の順化による耐病性の 向上

遺伝子発現解析を行うためには、環境条件や植物体の 状態の個体間差を減らすことが重要となるため、病害虫 を確実にフリー化でき、均一な植物体を準備できる無菌 培養個体を供試することを考えた. そこで, 無菌培養個 体に炭疽病菌を接種したところ、供試した'農2号'全 個体が枯死し、無菌培養した'農2号'は本来の耐病性 を発現していないことが示唆された、ランナー苗では通 常'農2号'は枯死しないため、順化によって耐病性が 向上すると予想し,順化期間と耐病性の関係について検 討した. 順化期間を順化なし (無菌培養個体),3 日,9 日,15日として、'農2号'と'とちおとめ'に炭疽病 菌を接種した.その結果,最も長い期間順化した '農 2 号'の順化 15 日個体でも、炭疽病菌接種 34 日後に 10 個体中2個体が枯死し、本来の耐病性を示すにはさらに 順化が必要と推察された.しかし、'農2号'の順化期間 が長くなるにつれて、耐病性が向上する傾向が明らかと なった (図 2-6 a). この '農 2 号' の順化によって耐病 性が向上する現象は、順化における何らかの外的要因に

よって耐病性が誘導された可能性を示唆する.病原菌の 感染以外での抵抗性誘導は、BTH や PBZ 等のプラント アクティベーター処理による SAR (Görlach et al., 1996; Yoshioka et al., 2001) や, Pseudomonas fluorescens や Plant Growth-Promoting Rhizobacteria による ISR (van Peer et al., 1991: Wei et al., 1991) 等が知られており、これらの処理 が施された植物体は、抵抗性が高められた"priming"状 態になる (Conrath et al., 2006). しかし、 'とちおとめ' は順化によって耐病性の向上が認められない.さらに'農 2号'は、順化期間が長くなるにしたがって耐病性が徐々 に向上していることから, 比較的短期間に抵抗性が誘導 される SAR や ISR と異なったメカニズムが予想される. 一方、BTHによって誘導される転写因子 WRKY45 を過 剰発現させたイネは、BTH 処理と同様にいもち病菌に対 する抵抗性が極めて高まることが明らかとなっている (Shimono et al., 2007). イチゴにも, 過剰発現させると "priming"状態になる転写因子が存在するのか、もし存 在するとしたら'農2号'と'とちおとめ'の間で発現 量に差が無いか、興味が持たれる.

また, '農2号'と 'とちおとめ'の無菌培養個体間で 平均発病度を比較すると,炭疽病菌接種6,13日後で'農 2号'の発病度が有意に低かった(表2-2).この結果は, 本来の耐病性には程遠いものの,無菌培養個体において も '農2号'耐病性機構の一部が発現していることを示 唆する. '農2号'の耐病性は,多くの遺伝子の関与が推 定されているため,その一部遺伝子が働いていると考え ることもできる.一方で,'農2号'と 'とちおとめ', さらに培養中と順化後,それぞれの個体で働いている遺 伝子は同じだが,発現量が異なる可能性も考えられる. いずれにしても,無菌培養個体は'農2号', 'とちおと め'の品種に関わらず耐病性が弱く,順化することによ って'農2号'の耐病性は向上するが'とちおとめ'は ほとんど変化しないことが明らかとなった.

これらの結果から、本実験系を用いて'とちおとめ' と'農2号'の無菌培養個体と順化個体の遺伝子発現解 析を行うことで、耐病性に関連する遺伝子を検索するこ とが可能と考えられた.また、順化期間の変更や炭疽病 菌の接種の有無を組み合わせることで、より多くの耐病 性関連遺伝子を同定できる可能性が示唆された.

### 第3章 イチゴにおける既知防御応答 遺伝子の発現解析

### 1 序論

植物が病害虫から身を守るためのメカニズムとして, SA, JA, ET 等のシグナル物質を介した防御応答経路が 存在し, SA 経路と JA/ET 経路は拮抗的に働くことが明 らかとなっている(Pieterse *et al.*, 2001; Glazebrook *et al.*, 2003). さらに, ABA を介した環境ストレス応答が, SA を介した防御応答と拮抗的に働く(Yasuda *et al.*, 2008; 安田・仲下, 2009). 近年, 植物の様々な情報伝達経路の 研究が盛んに行われ, ストレスに対する複雑な応答機構 が明らかとなりつつある.

炭疽病菌に対する防御応答については、アブラナ科炭 疽病菌 (C. higginsianum) を接種したシロイヌナズナの cDNA マイクロアレイ解析から, JA/ET 依存の防御応答 機構の関与が示唆されている (Narusaka et al., 2004). イ チゴに関しては、C. acutatum に対する中間的な耐病性品 種と感受性品種との間で、炭疽病菌接種後の遺伝子発現 解析が行われ, PR タンパク質や hypersensitive response タンパク質遺伝子が,感受性品種と比較して耐病性品種 でより早く、より強く発現上昇している (Casado-Díaza et al., 2006). また, PR 遺伝子である chitinase 遺伝子や β-1,3-glucanase 遺伝子が単離・解析されており、イチゴ に C. fragariae および C. acutatum を接種すると、それら の遺伝子はより C. fragariae で強く発現することが報告 されている (Khan and Shih, 2004; Shi et al., 2006). -方で、インゲンマメの chitinase 遺伝子を形質転換したイ チゴは, C. acutatum には耐病性を示さず (Vellicce et al., 2006)、炭疽病耐病性の複雑なメカニズムが示唆される. G. cingulata に対するイチゴの防御応答については, cDNA マイクロアレイ解析によって交雑個体の抵抗性識 別が試みられているが(平島ら,2009),他に知見は少な い

本章では既知の防御応答遺伝子を発現解析することで、 "農2号"の炭疽病菌に対する防御応答がどんな経路を 介しているのか、それとも既知の応答経路以外に依存し ているのか推定する.また、第2章で'農2号'の防御 応答の早さが耐病性に関連することを示唆したが、その 防御応答の早さを遺伝子発現レベルで裏付ける証拠を得 ることを目指した.さらに、'農2号'無菌培養個体の 順化による耐病性向上に伴って、推定防御遺伝子の発現 が変動するのかどうか検討した.

## 2 防御応答への関与が予想される遺伝子 の選抜

### 2-1 材料および方法

#### 2-1-1 供試 EST クローン塩基配列

供試 EST クローン塩基配列は、栃木県農業試験場(以 下,栃木農試)で作製した cDNA ライブラリーのクロー ンをシーケンスして得られた塩基配列を用いた. cDNA ライブラリーは、品種 'とちおとめ' の成熟果実、未成 熟果実, 花および葉由来の cDNA を pBluescript II SK+ベ クターにライゲーションし、大腸菌 XL10-Gold (Stratagene) に形質転換した. また, PCR-Select cDNA Subtraction Kit (Clontech)を用いて、炭疽病菌接種時に 特異的に発現する mRNA を濃縮したサブトラクション ライブラリーを、 'とちおとめ' および '農2号' のそれ ぞれで作製した. すなわち, 炭疽病菌分生子噴霧接種個 体の cDNA から滅菌純水噴霧個体の cDNA をサブトラク ションして, pGEM-T Easy ベクター (Promega) にライ ゲーションし、大腸菌 TOP10 (Invitrogen) に形質転換し てライブラリーとした. それらの cDNA クローンのうち, 順方向からシーケンスした 17,376 クローンの EST 配列 を CAP3 (Huang and Madan, 1999) でクラスタリングし, 得られた Singlet 5,512 個, Contig 1,887 個の計 7,399 個の 非重複 EST 配列を供試した.

### 2-1-2 防御応答遺伝子と相同性を示す EST クローンの 選抜方法

BLAST ソフトウェアをインストールしたパソコンに NCBI (ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/db/)のnr タンパク 質データベースをダウンロードし,非重複 EST 配列を BLASTX 検索した.検索条件は, Expect threshold を 10<sup>-50</sup> に設定し,機能が明らかで最も高い e-value を示すタンパ ク質の description から, SA, JA および ET 応答経路に関 与する遺伝子と相同性を示す EST 配列を選抜した.ただ し,WRKY型転写因子と相同性を示す EST 配列は, Expect threshold を 10<sup>-30</sup> に設定して検索した.また,リアルタ イム RT-PCR に使用するコントロール遺伝子として, Actin と最も高い相同性を示す EST 配列を選抜した.選 抜した EST 配列が Singlet である場合は,その cDNA ク ローンを以降の実験に供試した.Contig であった場合は, Contig を形成する cDNA クローンのうち,最もインサー トが長いと予想されるクローンを以降の実験に供試した.

### **2-1-3** 選抜した cDNA クローンのインサート全長塩基 配列の決定

(1) プラスミド DNA の抽出

供試 cDNA クローンは LB 培地 (100 μg/ml アンピシリ ンを含む;別表 2) で 37℃・一晩振とう培養し,遠心分 離によって回収した.回収した大腸菌は,Wizard Plus Minipreps DNA Purification System (Promega)を用い,付 属のプロトコールに従ってプラスミド DNA を抽出した.

#### (2) 塩基配列の決定

抽出したプラスミド DNA は、M13-47、dT18V、T3 (プ ラスミドが pBluescript II SK+の場合)または T7、SP6 (プ ラスミドが pGEM-T Easy の場合)をプライマーとし (別 表)、DTCS Quick Start Kit (BECKMAN COULTER)を用 いて付属のプロトコールに従い、シーケンス反応を行っ た.シーケンサーは CEQ8000 (BECKMAN COULTER) を用いた.得られた塩基配列は、配列情報解析ソフトウ ェア DNASIS pro(日立ソフトウェアエンジニアリング) を用い、インサート全長の塩基配列が得られたかどうか を確認した.なお全塩基配列が得られなかった場合、 cDNA 配列特異的プライマー(別表)を設計してさらに シーケンスを行い、全長が得られるまで繰り返した.プ ライマーの設計は、Primer 3 (http://frodo.wi.mit.edu/primer3 /input.htm)を用いた.

### 2-1-4 cDNA クローンインサート全塩基配列の BLASTX 検索とアミノ酸翻訳領域の推定

cDNA クローンインサートの全塩基配列を供試し, NCBI のホームページ上(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/ Blast.cgi)でnrデータベースに対しBLASTX検索を行っ た.検索条件はExpect threshold を 10<sup>-5</sup>に設定した.最も 高い e-value を示し機能が推定されている遺伝子の definition をもとに,供試した cDNA クローンに推定遺伝 子名を付与した.また,配列情報解析ソフトウェア DNASIS pro(日立ソフトウェアエンジニアリング)を用 いて ORF検索を行い,最も長い ORF を翻訳領域候補と した.さらに DNASIS pro ソフトウェアによって, cDNA クローン全塩基配列を推定アミノ酸配列に翻訳し,翻訳 領域候補の上流に終止コドンがある場合は,翻訳領域候 補を推定翻訳領域とした.上流に終止コドンが認められ ない場合は,BLASTX検索の結果を考慮し,翻訳領域の 全長を含むか上流部分が欠損しているかを推定した.

### 2-1-5 同じ推定遺伝子名が付与されたクローンの相同 性解析

同じ推定遺伝子名が付与されたクローンは, EBI の Pairwise Sequence Alignment Tool である EMBOSS Matcher (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss\_matcher/nucleotide .html)を用いて,塩基配列および推定アミノ酸配列の相

#### 2-2 結果

同性解析を行った.

7,399 個の非重複 EST 配列を供試して BLASTX 検索し た結果,防御応答に関与する 10 遺伝子と相同性を示す 13 個の cDNA クローンを選抜した(表 3-1). それらのク ローンは, SA による防御応答に関与する NPR1-like protein (Pilotti *et al.*, 2008), TGA transcription factor 2, WRKY78, Beta-1,3-glucanase (Ko *et al.*, 2003), Thaumatin-like protein (Fils-Lycaon *et al.*, 1996, Venisse *et al.*, 2002), JA による防御応答に関与する Lipoxygenase (Cheng *et al.*, 2006), Jasmonic acid-amino acid-conjugating enzyme (Kang *et al.*, 2006), Coronatine-insensitive 1 (Li *et al.*, 2004), ET による防御応答に関与する EIN2 (Shibuya *et al.*, 2004) と 相同性を示した. なお, リアルタイム RT-PCR に用いる 内部標準として, Actin と相同性を示すクローンを選抜し た(表 3-1).

次に、選抜した cDNA クローンのインサート全長をシ ーケンスした. その結果, サブトラクションライブラリ ーから得られた Suk018F08, Sut014H09 および Suk011A06 のインサート長は、それぞれ 405、405、444 bp であった. それ以外のクローンのインサート長は、Stg031F08の886 bpからStr002A03の2,222 bpの範囲内であった(表3-2). シーケンスで得られた塩基配列を供試し, NCBI nr デー タベースに対し BLASTX 検索を行った.供試した 13 ク ローンのうち Str014B05, Stg042B12, Str040D05, Str001G07, Sut014H09の5クローンは, EST 配列を供試 した BLASTX 検索結果と同じタンパク質と最も高い相 同性を示した.残りの8クローンについても、EST 配列 の結果と同じ Definition のタンパク質と最も高い相同性 を示した.また,相同性を示した遺伝子との間で最も e-value の低いクローンの Suk018F08 でも, WRKY78 と の間で 3E-48 という e-value を示し, Identities も 71%と 比較的高い相同性が認められた. そこで, Suk018F08 の 推定遺伝子名を WRKY とした (表 3-2). 同様に, それぞ れの供試クローンに最も高い相同性を持つ遺伝子の Definition をもとに表 3-2 の推定遺伝子名を付与し、それ らを推定防御応答遺伝子とした.

得られた塩基配列から, DNASIS pro ソフトウェアを用
いてアミノ酸配列を推定し, BLASTX 検索によって相同
性が認められたタンパク質と比較解析した.その結果,
Stg042B12, Str040D05 (*Beta-1,3-glucanase*), Stg021F11
(*Thaumatin-like protein*), Stg005C01, Stg017G02
(*Chitinase*)の5クローンは,開始コドンおよび終止コ

ドンが特定でき、翻訳領域全長を含むと推定された.推 定アミノ酸数はそれぞれ 324, 395, 244, 323, 323 であ った. その他のクローンは開始コドンが特定できず,特 にサブトラクションライブラリーから得られた Suk018F08 (WRKY), Sut014H09 (COII), Suk011A06 (EIN2) の3クローンは,終止コドンも認められなかった(表 3-3).

表 3-1 防御応答への関与が予想される EST クローン

クローン名	Contig <sup>1</sup>	BLASTX検索で相同性を示したタンパク質			
		Accession	Definition [Organism]	e-value	
Str025E07		ABA38911	NPR1-like protein [Prunus avium]	1E-111	
Str014B05		ABN09201	TGA transcription factor 2 [Populus tremula x	1E-103	
			Populus alba]		
Suk018F08	$\bigcirc$	NP_001237392	WRKY78 [Glycine max]	5E-40	
Stg042B12		AAL30426	Beta-1,3-glucanase [Prunus persica]	8E-76	
Str040D05		AAY25165	Beta-1,3-glucanase 1 [Ziziphus jujuba]	3E-61	
Stg021F11		AAM12886	Thaumatin-like protein [Malus x domestica]	3E-73	
Stg031F08		P50694	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase; Allergen Pru a 2;	5E-61	
			Thaumatin-like protein; Flags: Precursor [ <i>Prunus avium</i> ]		
Str002A03		AAZ57444	Lipoxygenase LOX1 [Populus deltoides]	2E-84	
Str001G07		ABC87760	Jasmonic acid-amino acid-conjugating enzyme	1E-100	
			[Nicotiana attenuata]		
Sut014H09		AAR82925	Coronatine-insensitive 1 [Solanum lycopersicum]	1E-58	
Stg005C01	$\bigcirc$	AAQ56598	Chitinase-like protein [Gossypium hirsutum]	2E-138	
Stg017G02		AAQ56599	Chitinase-like protein [Gossypium hirsutum]	1E-70	
Suk011A06	$\bigcirc$	AAR08678	EIN2 [Petunia x hybrida]	1E-52	
Str024G02	0	AAD41039	Actin [Malva pusilla]	8E-148	

○は, BLASTX 検索に Contig 配列を用いたものを示した.
 2) BLASTX 検索には, NCBI の nr データベースを用いた.

表 3-2 cDNA クローンのインサート全長配列を用いた BLASTX 検索結果

クローン	インサ	推定遺伝子名	BLASTX検索で	で相同性を示したタンパク質			
名	ート長		Accession	Definition [Organism]	アミノ	Identities	e-value
	(bp)			-	酸数		
Str025E07	1552	NPR1	ACN87218	NPR-1 [Pyrus x bretschneideri]	586	358/449 (80%)	0
Str014B05	1050	TGA2	ABN09201	TGA transcription factor 2	332	195/219 (89%)	2E-103
				[Populus tremula x Populus alba]			
Suk018F08	405	WRKY	NP_001237392	WRKY78 [Glycine max]	306	78/110 (71%)	3E-48
Stg042B12	1225	Beta-1,3-glucanase	AAL30426	Beta-1,3-glucanase [Prunus persica]	343	208/328 (63%)	1E-110
Str040D05	1600	Beta-1,3-glucanase	AAY25165	Beta-1,3-glucanase 1 [Ziziphus jujuba]	378	286/336 (85%)	2E-154
Stg021F11	965	Thaumatin-like	ADL16641	Thaumatin-like protein	247	239/242 (99%)	1E-180
		protein		[Fragaria chiloensis]			
Stg031F08	886	Thaumatin-lik e	AAB38064	Thaumatin-like protein precursor	245	154/223 (69%)	4E-89
		protein		[Prunus avium]			
Str002A03	2222	Lipoxygenase	ADO51752	Lpoxygenase [Camellia sinensis]	901	507/653 (78%)	0
Str001G07	1438	JAR1	ABC87760	Jasmonic acid-amino acid-conjugating	577	328/435 (75%)	0
				enzyme [Nicotiana attenuata]			
Sut014H09	405	COII	AAR82925	Coronatine-insensitive 1	603	109/134 (81%)	6E-57
				[Solanum lycopersicum]			
Stg005C01	1379	Chitinase	XP_002515664	Chitinase, putative [Ricinus communis]	321	236/271 (87%)	4E-141
Stg017G02	1284	Chitinase	ACM45714	Class II chitinase [Pyrus pyrifolia]	322	275/316 (87%)	5E-168
Suk011A06	444	EIN2	ACY78397	Ethylene insensitive 2 [Prunus persica]	1304	126/145 (87%)	9E-66
Str024G02	963	Actin	ACL97684	Actin 1 [Gossypium hirsutum]	377	226/227 (99%)	7E-125
					511	())/()	10 100

BLASTX 検索には, NCBI の nr データベースを用いた.

同じ推定遺伝子名が付与されたクローンは, Beta-1,3-glucanaseのStg042B12とStr040D05, Thaumatinlike proteinのStg021F11とStg031F08, Chitinaseの Stg005C01とStg017G02の3遺伝子6クローンであった. これらは, DNA レベルでそれぞれ 52.7 %, 65.2 %, 75.9 %, アミノ酸レベルでそれぞれ 35.6 %, 64.2 %, 80.8 %の相 同性であったため(表 3-4), それぞれ別の遺伝子と判 断した.

クローン名	推定遺伝子名	インサ	推定翻訳領域		BLASTX検索結果						
		ート長	開始	終止	アミノ	Query (	bp)	Subject	(aa)	アミノ	
		(bp)	(bp)	(bp)	酸数	start	end	start	end	酸数	
Str025E07	NPR1	1552	?	1347	?	1	1347	138	585	586	
Str014B05	TGA2	1050	?	706	?	2	658	98	316	332	
Suk018F08	WRKY	405	?	?	?	1	330	121	227	306	
Stg042B12	Beta-1,3-glucanase	1225	87	1058	324	78	1058	22	343	343	
Str040D05	Beta-1,3-glucanase	1600	236	1420	395	293	1300	21	355	378	
Stg021F11	Thaumatin-like protein	965	36	767	244	36	758	1	242	247	
Stg031F08	Thaumatin-like protein	886	?	670	?	2	670	26	245	245	
Str002A03	Lipoxygenase	2222	?	1964	?	6	1964	249	901	901	
Str001G07	JAR1	1438	?	1303	?	2	1297	142	576	577	
Sut014H09	COII	405	?	?	?	3	404	389	522	603	
Stg005C01	Chitinase	1379	63	1031	323	201	1013	42	312	321	
Stg017G02	Chitinase	1284	27	995	323	27	962	1	312	322	
Suk011A06	EIN2	444	?	?	?	8	442	293	437	1304	
Str024G02	Actin	963	?	682	?	2	682	151	377	377	

推定翻訳領域の開始の?は、開始コドンが特定できないこと、終止の?は終始コドンが確認できないことを示した.アミノ 酸数の?は開始コドンまたは終止コドンもしくは両方が推定できず、翻訳領域のアミノ酸数を推定できないことを示した.

表 3-4	同じ推定遺伝子	名が付与されたクロー	-ンの相同性解析結果
-------	---------	------------	------------

クローン名	インサ	塩基配列	比較		推定アミノ酸配列比較				
	ート長	一致塩基	Identity (bp)	Score	アミノ酸	一致アミノ	Identity (aa)	Similarity (aa)	Saora
	(bp)	数(bp)	()内は%		数 (aa)	酸数(aa)	()内は%	( )内は%	Score
Stg042B12	1225	020	400 (52 7)	502	331	320	117 (25.6)	192 (55.2)	402
Str040D05	1600	929	490 (32.7)	302	406	329	117 (33.0)	182 (33.3)	493
Stg021F11	965	802	597 (65 7)	1526	258	226	145 (64.2)	166 (72.5)	702
Stg031F08	886	892	382 (03.2)	) 1526	226	220	145 (64.2)	166 (73.5)	193
Stg005C01	1379	860	660 (75 0)	2452	213	212	172 (80.8)	190 (99 7)	084
Stg017G02	1284	869	000 (75.9)	2432	334	215	172 (00.0)	109 (88.7)	984

Identity, Similarity および Score は, EBIの EMBOSS Matcher によって相同性解析した結果を示した. bp は塩基対, aa はアミノ酸を示す.

### 3 防御応答シグナル物質処理が推定防御 応答遺伝子の発現に与える影響

### 3-1 材料および方法

### 3-1-1 供試植物

供試植物は 'とちおとめ' 無菌培養個体(移植後 28 日)を用いた. 無菌培養個体は, 第2章 3-1-1 にしたが って作製した.

### 3-1-2 供試遺伝子

供試遺伝子は,表 3-3の推定防御応答遺伝子の cDNA

クローン 13 個および内部標準として Str024G02 (Actin 遺伝子)を用いた.

### 3-1-3 防御応答シグナル物質の処理およびサンプリン グ

防御応答シグナル物質は、SA(和光純薬), MeJA(和 光純薬) および ET の前駆体である ACC(和光純薬)を 供試した. SA は 5mM に, MeJA および ACC は 100 µM に調製し, 1 個体当たり 1ml をペーパークロマト用噴霧 器で噴霧処理した.各処理個体は、24 時間後に地上部を サンプリングした.対照は滅菌純水を噴霧処理した.

#### 3-1-4 全 RNA 抽出および cDNA 合成

各サンプルの全 RNA 抽出は、向井・山本の方法(1997) を一部改変して行った.変更点は 2×CTAB solution の Tris 溶液の pH を 9.0 から 8.0 にしたこと、TE 飽和フェ ノール (pH 9.0) をクエン酸バッファー飽和フェノール (pH 4.3±0.2, SIGMA-ALDRICH) にしたことの 2 点で ある. 2  $\mu$ gの全 RNA を供試し、High Capacity RNA-tocDNA Kit (Applied Biosystems) を用い、プロトコールに したがって 1 本鎖 cDNA を合成した.その後、超純水で 4 倍希釈してリアルタイム RT-PCR に供試した.

### 3-1-5 リアルタイム RT-PCR

リアルタイム RT-PCR に用いるプライマーは, cDNA クローン塩基配列を用いて Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) により設計した. 使用したプライマーの配 列は別表1に示した.

リアルタイム RT-PCR は、10  $\mu$ 1の容量で1  $\mu$ 1の希 釈 cDNA 溶液を鋳型とした. 終濃度各 100  $\mu$ M のプライ マーペアを加え、Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)を用いて、StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems)により行った. PCR 条件は 95℃・10 分の後、95℃・15 秒、60℃・1 分を 40 回繰り 返した. 各遺伝子の相対発現量は、下記の式により滅菌

- 純水噴霧(水処理)個体の発現量を基準として算出した. 相対発現量=2<sup>-ΔΔCt</sup>
  - Δ Δ Ct=(比較するサンプルの Δ Ct) (水処理個体の Δ Ct)
  - ΔCt=(目的遺伝子のCt値) (ActinのCt値)

#### 3-2 結果

推定防御応答遺伝子として選抜した 13 クローンにつ いて、'とちおとめ'に防御応答シグナル物質を処理して 発現解析した.水処理と比較した SA 処理の相対発現量 は、Stg021F11 (*Thaumatin-like protein*)が 21.6 と大幅に 上昇した.また、Str025E07 (*NPR1*)、Suk18F08 (*WRKY*)、 Stg031F08 (*Thaumatin-like protein*)も、それぞれ 2.79、 3.60、3.41 と上昇した.一方、Stg017G02 (*Chitinase*)は 0.37 と低下した.水処理と比較した MeJA 処理の相対発 現量は、Str002A03 (*Lipoxygenase*)が 89.1 と大幅に上昇 した.また、Str001G07 (*JAR1*)は 1.88 に、Stg005C01 および Stg017G02 (*Chitinase*)はそれぞれ 1.48、1.69 に、 Stg042B12 (*Beta-1,3-glucanase*)は 2.40 に上昇した. ACC 処理による相対発現量は、Suk018F08 (*WRKY*)および Stg021F11 (*Thaumatin-like protein*)が 2.00 および 4.83 に上 昇した (図 3-1).



#### 図 3-1 防御応答シグナル物質処理後の推定防御応答遺伝子の発現解析結果

1)は各処理の相対発現量が 2 倍未満, 2)は 2~4 倍, 3)はそれ以上で分割した.相対発現量は,処理 24 時間後の発現量を示し, 水処理を基準として算出した. β-1,3-Glu は Beta-1,3-glucanase を,TLP は Thaumatin-like protein を示す.

### 4 炭疽病菌接種後の経時的な推定防御応 答遺伝子の発現解析

### 4-1 材料および方法

### 4-1-1 供試植物および順化

供試植物は、'農2号'および'とちおとめ'の無菌培 養個体(移植後66日間)を用いた.無菌培養個体は、第 2章 3-1-1 に従って作製した.順化は、液肥(大塚ハウス 1号 600 mg/l,大塚ハウス2号 400 mg/l,大塚ハウス5 号 10 mg/l)を入れたバットに無菌培養個体を移植し、 22℃・14時間日長のインキュベーターで40日行った.

#### 4-1-2 供試遺伝子

供試遺伝子は,前試験の SA 処理で発現上昇し SA 応 答経路のマーカー遺伝子として選抜した Stg021F11 (*Thaumatin-like protein*)を,JA 処理で発現が上昇しJA 応答経路のマーカー遺伝子として選抜した Str002A03 (*Lipoxygenase*)を用いた.また,SA 処理で発現上昇し た Str025E07 (*NPR1*),Suk018F08 (*WRKY*),Stg031F08 (*Thaumatin-like protein*)と内部標準として Str024G02 (*Actin*)を用いた.

#### 4-1-3 病原菌の接種およびサンプリング

イチゴ炭疽病菌の接種は、ペーパークロマトグラフ用 噴霧器を用いて、1個体あたり接種源1mlを噴霧した. 接種源の調整は、第2章2-1-2に従った.接種後はポリ エチレン袋を被せて、28℃・14時間日長のインキュベー ターで管理した.接種個体は、接種12、24および48時 間後に地上部をそれぞれ3個体ずつサンプリングした. 対照は滅菌純水を噴霧処理した.

#### 4-1-4 全 RNA 抽出および cDNA 合成

全 RNA の抽出および cDNA の合成は,本章 3-1-4 に従った.

#### 4-1-5 リアルタイム RT-PCR

リアルタイム RT-PCR は、本章 3-1-5 に従った.ただ し、実験は異なる植物体を用いて3回繰り返した.使用 したプライマーの配列は別表に示した.また各遺伝子の 相対発現量は、下記の式により実験1回目の 'とちおと め'水処理12時間後の発現量を基準として算出した.そ の後、3回の反復実験で得られた相対発現量を平均した 平均相対発現量を算出し,供試遺伝子ごとに Tukey 法に よる多重検定を行った.さらに,各経過時間の水処理と 炭疽病菌接種の間でt検定を行った.

相対発現量=2<sup>-ΔΔCt</sup>

Δ Δ Ct=(比較するサンプルのΔCt) - (実験 1 回目
 ・とちおとめ'水処理 12 時間後個体のΔCt)
 Δ Ct=(目的遺伝子のCt 値) - (Actin のCt 値)

#### 4-2 結果

SA および MeJA 処理によって発現が上昇し、それぞれ の応答経路のマーカー遺伝子と考えられた Stg021F11 (Thaumatin-like protein) および Str002A03 (Lipoxygenase) について、'とちおとめ'、'農2号'の順化個体に炭疽病 菌を接種し,経時的に遺伝子発現を解析した.その結果, Stg021F11の平均相対発現量が'とちおとめ'の接種 12, 24時間後にそれぞれ41.5,35.3と大きく上昇していたが, 全処理間で行った Tukey 法による多重検定で有意差 (P< 0.05) は認められなかった (図 3-2 1)). そこで個体ごと のデータを確認したところ、両処理とも3個体中1個体 のみが大きな値を示しており、再現性が劣っていた.農 2号'の処理12,24,48時間後において,水処理と炭疽 病菌接種個体の Stg021F11 の発現を比較すると、それぞ れ 1.66, 2.67, 2.16 倍と炭疽病菌接種により上昇してい た. 特に, 接種 24 時間後は t 検定で有意差 (P < 0.05) が認められた(表 3-5). Str002A03 の発現は、両品種と も各処理後経過時間において炭疽病菌接種により上昇し ていたが、最も上昇した'とちおとめ'24時間後で水処 理と比較して2.37倍であり、有意差も認められなかった (図 3-2 2), 表 3-5).

SA 経路に関与すると推定した他の3 供試クローンの 発現は、Stg031F08 (*Thaumatin-like protein*) で炭疽病菌 接種により上昇する傾向が認められたが、Str025E07 (*NPR1*) および Suk018F08 (*WRKY*) ではその様な傾向 は認められなかった. Stg031F08 は、'とちおとめ'炭疽 病菌接種 12 時間後の平均相対発現量 1.36 に対し、水処 理 24、48 時間後および'農 2 号'の全処理は平均相対発 現量がそれぞれ 0.38~0.62 となり、有意に低い値を示し た (図 3-2 5)). また Stg031F08 は、処理後経過時間ごと に水処理と炭疽病菌接種を比較すると、両品種とも炭疽 病菌接種により発現が上昇しており、特に'とちおとめ' の 24 時間後では 2.01 倍となり t 検定で有意差が認めら れた (表 3-5). 2) Str002A03 (Lipoxygenase)





供試品種





#### な発現解析結果

平均相対発現量は、3 反復の相対発現量の平均値とした.相対発現 量は、実験1回目の'とちおとめ'水処理12時間後の発現量を基準と して算出した.3回の反復実験は、異なる植物サンプルを用いた. エラーバーは標準偏差を示す.図中の同じアルファベットは、Tukey 法による多重検定で有意差がない(P<0.05)ことを示す.

表 3-5	炭疽病菌接種が推定防御応答遺伝子の発現に与える	る影響

クローン名	品種	処理後	平均相対発	的现金	b/a
(推定遺伝子名)		経過時間	水処理 (a)	炭疽病菌接種 (b)	_
Stg021F11	とちおとめ	12時間	0.66	41.52	62.65
(Thaumatin-like protein)	とちおとめ	24時間	0.38	35.27	92.77
	とちおとめ	48時間	2.86	4.09	1.43
	農2号	12時間	0.93	1.55	1.66
	農2号	24時間	0.81	2.15	2.67 *
	農2号	48時間	1.06	2.29	2.16
Str002A03	とちおとめ	12時間	1.27	1.79	1.41
(Lipoxygenase)	とちおとめ	24時間	1.64	3.90	2.37
	とちおとめ	48時間	1.95	2.86	1.46
	農2号	12時間	0.50	0.67	1.34
	農2号	24時間	0.87	1.22	1.40
	農2号	48時間	1.72	2.81	1.64
Str025E07	とちおとめ	12時間	0.81	0.76	0.94
(NPR1)	とちおとめ	24時間	0.67	0.59	0.87
	とちおとめ	48時間	1.38	0.89	0.64
	農2号	12時間	0.61	0.48	0.78
	農2号	24時間	0.75	0.49	0.66
	農2号	48時間	1.72	1.16	0.68
Suk018F08	とちおとめ	12時間	1.26	1.60	1.27
(WRKY)	とちおとめ	24時間	0.96	1.36	1.42
	とちおとめ	48時間	1.45	1.39	0.95
	農2号	12時間	1.82	1.94	1.06
	農2号	24時間	3.72	2.95	0.79
	農2号	48時間	4.44	0.96	0.22
Stg031F08	とちおとめ	12時間	0.70	1.36	1.94
(Thaumatin-like protein)	とちおとめ	24時間	0.38	0.76	2.01 *
	とちおとめ	48時間	0.46	0.64	1.39
	農2号	12時間	0.47	0.53	1.15
	農2号	24時間	0.39	0.58	1.50
	農2号	48時間	0.40	0.62	1.56

平均相対発現量は,3回の反復実験の 各相対発現量の平均値とした.相対発 現量は,実験1回目の'とちおとめ' 水処理12時間後の発現量を基準として 算出した.3回の反復実験は,異なる植 物サンプルを用いた.\*は,水処理と炭 疽病菌接種の間でt検定により有意差 (P<0.05)が認められたことを示す.

### 5 順化期間の違いが推定防御応答遺伝子 の発現に与える影響

### 5-1 材料および方法

#### 5-1-1 供試植物および順化とサンプリング

供試植物は、'農2号'および'とちおとめ'の無菌培養個体(移植後48日)を用いた.無菌培養個体は、第2章 3-1-1 に従って作製した.無菌培養個体の順化は、ニッピ良菜培土SP200を詰めた7.5cm黒ポリポットに移植し、22℃・14時間日長のインキュベーターで、それぞれ3日または9日間管理した.対照は無菌培養個体とした.なお、無菌培養個体,順化3日個体および順化9日個体を同時にサンプリングするため、移植48日後に順化9日個体を順化し、その6日後に順化3日個体を順化、無菌培養個体は更に3日間培養してサンプリングした.各処理個体は、地上部をそれぞれ3個体ずつサンプリングした.

#### 5-1-2 供試遺伝子

供試遺伝子は,表 3-3 の推定防御応答遺伝子とした 13 クローンおよび内部標準として Str024G02 (Actin)を用 いた.

#### 5-1-3 全 RNA 抽出および cDNA 合成

全 RNA の抽出および cDNA の合成は,本章 3-1-4 に従った.

#### 5-1-4 リアルタイム RT-PCR

リアルタイム RT-PCR は、本章 3-1-5 に従った.ただ し、実験は異なる植物体を用いて3回繰り返した.使用 したプライマーの配列は別表に示した.また各遺伝子の 相対発現量は、下記の式により実験1回目の 'とちおと め'無菌培養苗の発現量を基準として算出した.その後、 3回の反復実験で得られた相対発現量を平均した平均相 対発現量を算出し、供試遺伝子ごとにTukey 法による多 重検定を行った.

相対発現量=2<sup>-ΔΔCt</sup>

Δ Δ Ct=(比較するサンプルの Δ Ct) - (実験 1 回目
 'とちおとめ' 無菌培養個体の Δ Ct)

 $\Delta Ct = (目的遺伝子のCt値) - (Actin のCt値)$ 

#### 5-2 結果

推定防御応答遺伝子として選抜した 13 cDNA クローンの遺伝子発現に与える順化の影響について, 'とちおとめ'および'農2号'の無菌培養個体, 順化3 および9

日間で比較するとともに、全処理間で Tukey の多重検定 を行った. SA 応答経路に関連すると推定される Str025E07 (NPR1) の 'とちおとめ' では, 順化期間が 長くなるにつれて発現量が若干上昇する傾向が認められ たが、有意差は無かった(図 3-3 1)). Str014B05 (TGA2) は、両品種とも順化期間が長くなるにつれて発現量が若 干低下する傾向が認められたが、品種内での有意差は無 かった (図 3-3 2)). Suk018F08 (WRKY) の 'とちおとめ' は、順化期間が長くなるにつれて発現量が増加する傾向 が認められたが、有意差は無かった. '農2号'は、順化 期間による発現量の変化は無かった(図 3-3 3)). Stg042B12 (beta-1,3-glucanase) は、両品種とも無菌培養 個体から順化3日後に発現が上昇し、9日後には低下す るパターンを示したが、有意差は無かった. 無菌培養個 体を比較すると、 'とちおとめ' の 1.03 に対し '農2号' は 3.31 と高い値を示した (図 3-3 4)). Str040D05 (beta-1,3-glucanase) は、 '農2号' において順化期間が 長くなるにつれて発現量が低くなる傾向が認められた. 'とちおとめ'は、順化期間による発現量の変化はほん とんど無かった (図 3-3 5)). Stg021F11 (Thaumatin-like protein)は、順化によって大きく発現量が上昇したが、 個体間差が大きかったため有意差は認められなかった

(図 3-3 6)). Stg031F08 (*Thaumatin-like protein*) は, 'と ちおとめ'および'農2号'無菌培養個体の平均相対発 現量 1.05, 0.71 に対し, 'とちおとめ'の順化3,9日個 体, '農2号'の順化3,9日個体の0.31,0.47,0.26,0.28 と有意に低い値を示し,順化によって発現が低下した. また, 'とちおとめ'と'農2号'の無菌培養個体間でも 有意差が認められた(図 3-37)).

JA 応答経路に関連すると推定される Str002A03 (Lipoxygenase) は、両品種とも順化期間が長くなるにつ れて発現量が高くなる傾向が認められたが、有意差は無 かった (図 3-3 8)). Str001G07 (JARI) は、 'とちおと め'無菌培養個体の平均相対発現量1.01に対し、順化3 および9日個体はそれぞれ1.75および1.95と有意に高い 値を示した.一方、'農2号'における無菌培養,順化3, 9日個体の Str001G07 の発現量は、それぞれ 1.40、 1.92、 1.44 であり順化3日個体が最も高い値を示したが、有意 差は無かった(図 3-3 9)). Str001G07 (COII)は、両品 種とも順化によって発現量が低下する傾向が認められた が,有意差は無かった(図 3-3 10)). Stg005C01(Chitinase) は、両品種とも順化によって発現量が高くなる傾向が見 られ、'とちおとめ'でより顕著だったが有意差は無かっ た (図 3-3 11)). Stg017G02 (Chitinase) は、 'とちおと め'無菌培養個体の平均相対発現量 2.54 に対し順化 3,9

日個体がそれぞれ 4.10, 6.95 と上昇し, 特に順化 9 日個 体は有意に高かった.また'農2号'は、無菌培養個体 の平均相対発現量 2.68 に対し, 順化 3,9日個体が 4.34, 5.92 と有意に高かった(図 3-3 12)). Suk011A06 (EIN2)

1) Str025E07 (NPR1)





5) Str040D05 (Beta-1,3-glucanase)

とちおとめ

1.4

1.2

0.2

0.0

∎ ∎

は、 'とちおとめ' では有意な差は認められなかったが、 '農2号'では無菌培養個体の0.98に対し,順化3,9 日個体は 0.77, 0.78 で若干ではあるが有意に低かった(図 3-3(13)).







6) Stg021F11 (Thaumatin-like protein)





農2号

供試品種

### 図 3-3 順化期間が推定防御応答遺伝子の発現に与える影響

相対発現量は、実験1回目の'とちおとめ'無菌培養個体を基準として算出した.実験は、異なるサンプルを用いて3回反復 した.エラーバーは標準偏差を示す.順化なしは無菌培養個体を,順化3日および9日は無菌培養個体をそれぞれの期間順化し た個体を意味する.図中の同じアルファベットは、Tukey法による多重検定で有意差がない(P<0.05)ことを示す.



### 6 考察

### 6-1 推定防御応答遺伝子の選抜

G. cingulata によるイチゴ炭疽病に対する '農2号'の 耐病性は,自殖集団の抵抗性程度が連続的に分離してい る(沖村ら,2004). そのため,寄与率の低い複数のQTL 遺伝子に支配されていると推定されるため,それらの遺 伝子を同定することは難しいと予想される.一方,第2 章で '農2号'の防御応答の早さと耐病性との関連性が 示唆されたため,両供試品種間で防御応答遺伝子の発現 パターンを解析することにより,耐病性機構の一端を明 らかにすることが可能と考えられる.しかし,G. cingulata に対するイチゴの防御応答経路については知られていな い.そこで,栃木農試で蓄積したイチゴ EST クローンか ら, SA, JA, ET 応答経路に関連すると考えられる遺伝 子を BLASTX 検索結果の Definition に基づき選抜した.

SA 応答経路に関連する遺伝子として、応答経路の鍵 となる NPR1 (Cao et al., 1994, Cao et al., 1997) および NPR1 と相互作用する TGA2 (Fan and Dong, 2002) と相 同性を示す cDNA クローンが、それぞれ選抜された. NPR1 は多量体で細胞質中に存在し、SA 蓄積によるレド ックス変化によって一量体となる.その後,核に移行し て TGA 転写因子と相互作用し, TGA 転写因子の DNA 結合能が活性化された結果として, PR タンパク質遺伝子 の発現を活性化する (Pieterse and Van Loon, 2004). その ため, PR タンパク質である Beta-1,3-glucanase (Vögeli-Lange et al., 1988; Meins and Ahl, 1989; Ward et al.,1991 ; Uknes et al., 1992 ; Shi et al., 2006) & Thaumatin -like protein (Woloshuk et al., 1991; Uknes et al., 1992; Schaffrath et al., 1997) はマーカー遺伝子としての利用が 可能と考えられたため、それらの遺伝子と相同性を示す クローンをそれぞれ2個選抜した. さらに, WRKY 転写

因子も防御応答への関与が予想されるため、相同性を示 すクローンを選抜した. WRKY 転写因子は SA 応答経路 に関わる報告(Yu *et al.*, 2001; Chen and Chen, 2002; Shimono *et al.*, 2007)が多いが、SA 応答経路を正に制御 するとともに JA 応答経路を負に制御するもの(Li et al., 2004; Qiu *et al.*, 2007), SA 応答経路を負に制御するもの (Kim et al., 2008), さらに SA, JA 応答経路以外の防御 応答にかかわるもの(Dellagi *et al.*, 2000)等様々な防御

応答への関連が報告されている.そのため,一応 SA 応 答経路に位置付けたが,他の応答経路に関与する可能性 もある.

JA 応答経路に関連する遺伝子については、JA 合成に 関わる α-リノレン酸代謝の最初の反応を触媒する Lipoxygenase (Vick and Zimmerman, 1984), JA とイソロ イシンを結合させる JAR1 (Staswick *et al.*, 2002, Staswick and Tiryaki, 2004), さらに JAZ タンパク質と結合する COII (Feys *et al.*,1984, Xie *et al.*, 1998) と相同性を示す クローンが選抜された. JAZ タンパク質は、JA 応答性遺 伝子の転写を抑制するリプレッサーとして働き、 SCFCOII ユビキチンリガーゼと26S プロテアソームによ って分解されることで JA 応答遺伝子群の発現が活性化 されるが、その時 JA-イソロイシン結合体が JAZ タンパ ク質と COII の物理的相互作用を促進する (Thines *et al.*, 2007; Chini *et al.*, 2007). また、JA/ET 応答経路の活性 化に伴って発現上昇する PR タンパク質として、Chitinase

(Chen and Bleecker, 1995; Thomma *et al.*, 1998; Thomma *et al.*, 1999; Norman-Setterblad *et al.*, 2000) と相同性を示 す 2 クローンが選抜された. さらに, ET 応答経路に関連 する遺伝子として EIN2 と相同性を示すクローンが選抜 された (Chen and Bleecker, 1995; Thomma *et al.*, 1999; Alonso *et al.*, 1999).

選抜された 10 遺伝子 13 クローンは、インサート全長 をシーケンスし、得られた配列を用いて再度 BLASTX 検 索を行った. その結果、5 クローンは EST 配列による BLASTX 検索と同じタンパク質に最も高い相同性でヒ ットし、残りの 8 クローンも EST 配列と同じ Definition のタンパク質にヒットした. そこで、それらの Definition を基に各クローンの推定遺伝子名を付与し、各クローン を推定防御応答遺伝子とした. 推定防御応答遺伝子から 翻訳されると推定されるタンパク質について、防御応答 経路上の位置関係を図 3-4 に示した. イチゴではこれら の遺伝子のうち、WRKY 転写因子をコードする Fa WRKYI 遺伝子が同定されており、SA、JA、ET 応答経路 への関与が推定されている (Encinas-Villarejo et al., 2009). しかし、選抜されたクローンとは相同性が低いため、異 なる遺伝子と考えられた.また,NCBI のタンパク質デ ータベースに登録されているイチゴ PR タンパク質は,  $\beta$ -1,3-glucanase が 25 件,Thaumatin-like protein が 4 件, Chitinase が 12 件である (2012 年 3 月現在).選抜された 3 遺伝子 2 クローンずつ計 6 クローンの PR タンパク質の うち,BLASTX 検索でイチゴ PR タンパク質と最も高い 相同性でヒットしたのは,F. chiloensis の Thaumatin-like protein に対する 1 クローンのみであった (表 3-2).その ため選抜されたクローンは,各応答経路が活性化された 時に発現解析を行い,応答経路への関与を確認する必要 があると考えられた.



### 図 3-4 推定防御応答遺伝子タンパク質の予想される防御 応答経路上の位置

SA:サリチル酸, JA:ジャスモン酸, ET:エチレン, NPR1: Nonexpresser of pathogenesis-related proteins 1, TGA2:bZIP型転 写因子, WRKY:WRKY型転写因子, PR: Pathogenesis-related, JAR1:Jasmonate resistant 1, COII:Coronatine insensitive 1, EIN2: Ethylene insensitive 2

# 6-2 推定防御応答遺伝子による'農 2 号'と'とちおとめ'の防除応答速度推定の試み

推定防御応答遺伝子として選抜した 13 クローンにつ いて,推定した応答経路に本当に関係するかどうか,SA, MeJA および ACC を処理した'とちおとめ'無菌培養個 体における発現を確認した.SA 処理では,Str025E07

(*NPR1*), Suk018F08 (*WRKY*), Stg021F11, Stg031F08 (*Thaumatin-like protein*)の3遺伝子4クローンの発現が 水処理と比較して上昇した(図 3-1). これらの結果と塩 基配列の相同性から,これら4クローンはSA応答経路 に関与する可能性が示唆される.特にStg021F11の発現 は、 'とちおとめ' 水処理に対して SA 処理で 20 倍以上 上昇し、SA 応答経路のマーカー遺伝子として有望と考 えられた.しかし、Stg021F11と Suk018F08の ACC 処理 の発現は SA 処理ほどではないが上昇しており、SA 応答 経路以外に関与するかもしれない.

MeJA 処理では, Str002A03 (*Lipoxygenase*) および Str001G07 (*JARI*) の 2 遺伝子 2 クローンの発現が水処 理と比較して上昇した (図 3-2). 特に Str002A03 は約 90 倍と大きく上昇し, JA 応答経路のマーカー遺伝子として 有望と考えられた. また, Stg005C01 および Stg017G02

(Chitinase)の発現は、水処理に対し MeJA 処理でそれ ぞれ 1.5 倍程度に上昇し、SA 処理および ACC 処理では 発現が抑制される傾向が認められた. SA 経路と JA/ET 経路は拮抗的に働くことから、SA 処理によって両クロ ーンの発現が抑制されたと考えられる.しかし、ACC 処 理で抑制傾向を示したこと、MeJA 処理での発現上昇が 小さかったことから、JA 応答経路との関連は判然としな かった.

第2章では'農2号'の防御応答の早さが,耐病性の 1 つの要因として推察された.そこで,無菌培養苗を順 化した'とちおとめ'と'農2号'を用いて,推定防御 応答遺伝子の発現上昇パターンを解析し,炭疽病菌に対 する防御応答経路の推定と'農2号'の防御応答の早さ を遺伝子発現レベルで明らかにすることを試みた.まず, SA 応答経路のマーカー遺伝子として Stg021F11

(Thaumatin-like protein) を供試し、炭疽病菌に対して SA 経路が応答するかどうか検討した.両品種に炭疽病 菌を接種し,経時的に Stg021F11 の発現を解析したとこ ろ, 接種 12, 24 時間後の 'とちおとめ' 炭疽病菌接種個 体で大きく上昇していが,有意差は無かった(図 3-2 1)). その理由は個体間差が大きかったためで、炭疽病菌接種 による応答が不安定なのか、他の要因に応答しているの かも含め、再現性の確認が必要と考えられた.一方、'農 2号'の Stg021F11 の発現は炭疽病接種により各経過時 間とも上昇した. しかし, 接種 24 時間後の 2.67 倍が最 も高く(表 3-5), SA 処理時の発現上昇(21.6 倍)と比 較すると小さかった(図 3-2 3)). そこで, SA 処理で発 現が上昇した Str025E07 (NPR1), Suk018F08 (WRKY), Stg031F08 (Thaumatin-like protein) についても発現解析 を行った. その結果, Stg031F08 の発現は炭疽病菌接種 によって上昇しており、'農2号'より'とちおとめ'の 方が早くかつ強く上昇する傾向を示したが、全体的に小 さな変動に留まっていた(表 3-5). SA 応答経路のマー カー遺伝子としては、他に $\beta$ -1,3-glucanase 遺伝子が良く 利用される (Uknes et al., 1992). 本研究では SA 処理で

発現上昇する  $\beta$ -1,3-glucanase 遺伝子が得られず,実験に は供試できなかった.この点に関しては、既に単離され ている β-1,3-glucanase 遺伝子 (Shi et al., 2006) なども研 究対象に加え、再検討の必要があるかもしれない. しか し, Thaumatin-like protein 遺伝子とβ-1,3-glucanase 遺伝 子の発現パターンは、リンゴに Erwinia amylovora や Pseudomonas syringae pv. tabaci を接種した時,シロイヌ ナズナに SA 処理や Pseudomonas syringae pv. tomato を接 種した時には同じ様なパターンを示した(Uknes et al., 1992; Cao et al., 1994; Venisse et al., 2002). そのため Thaumatin-like protein 遺伝子の発現パターンのみで, SA 経路応答の有無を判断できる考えられた. したがって, 本実験の 2 つの Thaumatin-like protein 遺伝子の発現パタ ーンから、炭疽病菌に対する防御応答には SA 経路が働 いていることが示唆される.しかし, SA 処理時の発現 上昇との比較から強い誘導は起きておらず、他に主要な 防御応答のメカニズムが働いていると推察された.

次に、JA 応答経路のマーカー遺伝子として Str002A03 (Lipoxygenase)を供試し、発現パターンを解析した.その結果、疽病菌接種によって1.34~2.37倍と若干の発現 上昇は認められたが、有意差は無かった(図 3-2 2)、表 3-5).そのため、JA 処理時のような強い JA 応答経路の 誘導は起きていないと考えられた.一方で JA 応答経路 のマーカー遺伝子としては、他に Chitinase 遺伝子や PDF1.2遺伝子が利用される(Thomma et al., 1998).本実 験では供試していないが、Lipoxygenase は JA を合成する 鍵酵素であり、Lipoxygenase 遺伝子と推定される Str002A03はJA 処理によって発現が大きく上昇すること から(図 3-2 3))、JA 応答経路のマーカー遺伝子として 十分に機能していると考えられる.したがって、炭疽病 菌の防御応答には JA 経路は関与しないと予想された.

これらの結果を総合すると、炭疽病菌に対する防御応 答にJA応答経路は関与していないと推測され、SA応答 経路の関与についてはあるかもしれないが寄与率は低い と考えられた.また、炭疽病菌に対する防御応答経路が 特定できなかったため、'農2号'における防御応答の早 さを遺伝子発現レベルで検証する試みはできなかった.

### 6-3 '農2号'の順化による耐病性向上と推定防御応 答遺伝子との関連

第2章で、炭疽病耐病性品種 '農2号'の無菌培養個 体は通常の耐病性を示さず、順化によって耐病性が向上 することを明らかにした.そこで、推定防御遺伝子が順 化に伴って発現が変動するのかどうか検討した. SA 応 答経路への関与が推定される遺伝子については、PR タン パク質である Thaumatin-like protein 遺伝子と推定される Stg021F11 と Stg031F08 の発現量が明確で対照的な変化 を示した. Stg021F11の発現は、'とちおとめ'、'農2号' 両品種とも順化によって大きく上昇したが有意差はなか った(図 3-3 6)). 一方 Stg031F08 は、両品種とも無菌培 養個体に比べ順化3日,9日個体の発現が有意に低く(図 3-37)),順化による発現抑制が認められた.順化は培養 ビンのフタを開放し、湿度をコントロールしないインキ ュベーター中に置いたため、それまで100%近かった湿 度が低下して乾燥ストレスが加わったと推定される. 乾 燥ストレスは ABA 応答経路を誘導し、ABA を介した環 境ストレス応答は SA 応答と拮抗的に働く(Umezawa et al., 2010; Yasuda et al., 2008). 結果として, Stg031F08の 発現が低下したと考えると筋が通るため, Stg021F11 の 発現上昇は他の要因による可能性も示唆される.炭疽病 菌接種時の Stg021F11 の発現上昇についても個体間差が

認められており,何らかの要因で大きく発現上昇する遺 伝子と考えられる.また,SA 処理した'とちおとめ' において Str025E07 (*NPRI*)の発現は上昇したが(図 3-1 1)),順化による発現変動はほとんどない(図 3-3 1)).こ れらの結果から,順化によって SA 経路が活性化された とは考えにくい.さらに,JA 応答経路への関与が推定さ れる遺伝子は,Str002A03 (*Lipoxygenase*),Str001G07

(*JAR1*), Stg005C01 (*Chitinase*), Stg017G02 (*Chitinase*) の発現が,順化により上昇または上昇傾向を示した(図 3-3). これらの結果から,順化によって JA 応答経路が若 干活性化されている可能性があるが, JA 処理と比較する と特に Str002A03 (*Lipoxygenase*)の発現上昇が小さい(図 3-1). また, '農 2 号'の順化で特異的に上昇する遺伝子 も認められないため,順化による耐病性の向上との関連 性は薄いと考えられた.

### 第4章 無菌培養 '農2号'の順化による 耐病性向上に関与する遺伝子の検索

### 1 序論

イチゴにおける cDNA マイクロアレイ解析は、イチゴ 果実由来の1,701 個の cDNA クローンをスポットしたマ イクロアレイを用い、果実の香りや果実の成熟に伴う一 連の解析が行われている(Aharoni *et al.*, 2000; Aharoni *et al.*, 2002; Aharoni and O'Connell, 2002; Aharoni *et al.*, 2004). 一方, 耐病性や防御応答に関するアレイ解析は、前述し た交雑個体の炭疽病抵抗性の識別の試みが報告されてい る(平島ら, 2009)ほか見当たらない. NCBI(http://www. ncbi.nlm.nih.gov/)の EST データベースで Fragaria を検 索すると 60,012 件, Fragaria × ananassa を検索すると 11,784 件がヒットするため(2012 年 3 月現在), EST の 蓄積は徐々に進んでいると考えられる. しかし、GDR

(http://www.rosaceae.org/)の Fragaria Assembly V4 Libraries の 50,882 EST の中には,病原菌を接種した植物 体から得られた EST は含まれておらず,防御応答に関連 する SA を処理した植物体から得た EST が含まれるのみ である.一方,栃木農試が蓄積した EST には,炭疽病菌 を接種した個体の cDNA から水処理個体の cDNA をサブ トラクションしたライブラリーから得たものが含まれて いる.そのため,それらのクローンを含め非重複の 8,056 クローンをスポットした栃木農試の cDNA マイクロアレ イは,炭疽病の耐病性や防御応答に関する解析にも十分 に対応できると考えられる.

第2章で、、、農2号、の無菌培養個体は通常の炭疽病耐 病性を示さず、順化によって耐病性が向上することを明 らかにした.それに対して、とちおとめ、は無菌培養個 体、順化個体に関わらず感受性である.(農2号)を順化 した時に特異的に発現が変化する遺伝子が選抜できれば、 高率に、農2号、の順化に伴う耐病性向上に関与する遺 伝子が含まれていることが期待される.そこで本章では、 栃木農試で作製した cDNA マイクロアレイを用いて、そ れらの耐病性向上に関与する遺伝子を検索する.アレイ 解析によって選抜されたクローンは、GO による機能分 類を試みた後、リアルタイム RT-PCR による詳細な発現 解析を行った.

### 2 材料および方法

#### 2-1 供試植物および順化とサンプリング

供試植物は、'農2号'および'とちおとめ'無菌培養

個体(移植後46日間)を用いた.無菌培養個体は,第2 章 3-1-1 にしたがって作製した.順化は,培養ビンのフ タを取り除き,22℃・14時間日長のインキュベーターで 3 日間行い,順化個体とした.灌水は,ハンドスプレー を用いて水道水を適宜噴霧した.対照は無菌培養個体と した.各供試個体は,展開葉3枚を付けた状態の地上部 をそれぞれ3個体ずつサンプリングした.

また,遺伝子発現解析の対照とするため,'農2号'お よび'とちおとめ'は温室で養液栽培(直井ら,2008) を行い,温室個体を育成した.温室個体の RNA 抽出用 サンプルは,完全に展開した最上位葉の葉身とし,3月 下旬にそれぞれ3個体からサンプリングした.

#### 2-2 全 RNA 抽出

全 RNA の抽出は, 第3章 3-1-4 に従った.

### 2-3 cDNA マイクロアレイの作製

### 2-3-1 供試 cDNA クローン

供試 cDNA クローンは、第3章 2-1-1 で供試した栃木 県農業試験場で蓄積した EST クローンを用いた.ただし、 未成熟果実由来の cDNA クローンを更に加え、合計 19,970 クローンを CAP3 (Huang and Madan, 1999) でク ラスタリングし、得られた非重複の 8,056 クローンをマ イクロアレイ作製に供試した.それらの cDNA クローン の由来は、'とちおとめ'の葉 (838 クローン)、花 (715 クローン)、未成熟果実 (3,009 クローン) および成熟果 実 (1,759 クローン) である.さらに、炭疽病菌接種イチ ゴ個体の cDNA から無接種個体の cDNA をサブトラクシ ョンしたライブラリーを 'とちおとめ'および'農2号' で作製し、それらのライブラリーから得られたそれぞれ 861 クローンおよび 874 クローンを供試した.

#### 2-3-2 インサートの PCR 増幅

供試 cDNA クローンのうち, pBluescript II SK+ vector に導入されているクローンはプライマーT7 および T3, pGEM-T Easy vector に導入されているクローンは T7 お よび SP6 を用い, PCR によりインサートを増幅した.各 プライマーの配列は別表 1 に示した. PCR 反応液組成は, 終濃度 1×PCR buffer, 0.2 mM dNTP mixture,各 0.25  $\mu$ M のプライマーペアとし,80  $\mu$ l の容量に2 U の *Taq* DNA polymerase (Takara Taq:タカラバイオ)を加えた.反応 条件は,94°C・2 分の後,94°C・1 分,52°C・1 分,72°C・ 3 分を 35 回繰り返した後,72°C・10 分とした.得られた PCR 産物はイソプロピルアルコール沈殿後,20  $\mu$ l の超純 水に懸濁した.1  $\mu$ l の DNA 溶液をアガロース電気泳動し, **PCR** 増幅状況を確認した. **DNA** 溶液 10 µl に **DMSO** 10 µl を加えてよく混合し,供試スポット **DNA** とした.

#### 2-3-3 スポッティング

アレイスライドは、DMSO 対応高密度化アミノ基導入 タイプ DNA マイクロアレイ用コートスライドガラス(松 浪硝子)を用い、図 4-1 のレイアウトでスポットした. 一部クローンが重複しているため、サンプルが 8,711 ス ポット(非重複 cDNA クローンとしては 8,056 クローン) となり、コントロールとしてえ DNA (タカラバイオ) 241 スポットおよび Human TFR DNA (タカラバイオ) 241 スポットおよび Human TFR DNA (タカラバイオ) 248 スポットで、合計 9,200 スポットであった. スポッター は MicroGrid II (Digilab:前 BioRobotics)を用いた. ス ポットしたアレイスライドは、UV クロスリンカー(UVP, CL-1000) で 60 mJ の UV を照射した後、ドライキャビネ ット中で保存した.



図 4-1 作製したイチゴ cDNA マイクロアレイのレイアウト

#### 2-4 cDNA マイクロアレイ解析

#### 2-4-1 ターゲットサンプルの調製

各植物サンプルから抽出した total RNA は, SuperScript RNA Amplification System (Invitrogen)を用いて増幅した. その後, CyScribe cDNA Post Labelling Kit (GE Healthcare) を用いて増幅 RNA 500 ng を逆転写し, 無菌培養個体を Cy3, 順化個体を Cy5 で標識した.

#### 2-4-2 ハイブリダイゼーション

Cy3 および Cy5 で標識した 1 本鎖 cDNA は,品種ごと に同一のスライド上でハイブリダイゼーションを行った. ハイブリダイゼーションは,5×SSC,25% formamide, 0.1% SDS,0.2 mg/ml poly dA の条件で 42 $^{\circ}$ C・19 時間行 った.洗浄は 2×SSC,0.1% SDS で 50 $^{\circ}$ C・1分を5回, 0.1×SSC,0.1% SDS で 40 $^{\circ}$ C・2分を3回,0.1×SSC で 20 $^{\circ}$ C・1分を4回行った.ハイブリダイゼーションおよ び洗浄は,GeneTAC Hybridization Station (Digilab:前 Genomic Solutions)を用いた.

#### 2-4-3 シグナルの検出および数値化

シグナルの検出および数値化は、アレイスキャナー GenePix 4000B(Danaher:前 Axon Instruments)および画 像解析ソフト GenePix Pro 6.1 (Danaher:前 Axon Instruments)を用いた.各スポットの蛍光強度は、中央 値からスポット周辺のローカルバックグランドの中央値 を引いた値を用いた.Cy3とCy5の両方の蛍光強度が、 ローカルバックグランドの中央値の2倍より小さなスポ ットは排除した.残ったスポットを用いて、Cy3とCy5 の総蛍光強度が等しくなるように補正した.その後、 Acuity 4.0 (Danaher:前 Axon Instruments)を用いて LOWESS 補正を行い、得られたLog ratio [Log2 {Cy5 (順 化個体) 蛍光強度/Cy3 (無菌培養個体) 蛍光強度}]を 解析に用いた.実験は異なる個体を用いて3回繰り返し た.

### 2-5 cDNA マイクロアレイ解析結果によるクローンの 選抜

### 2-5-1 順化によって '農 2 号' 特異的に発現が上昇する 遺伝子

cDNA マイクロアレイの結果から、順化によって '農 2号'の発現が上昇し'とちおとめ'では変わらないか 低下する cDNA クローン(順化による '農 2 号' 特異的 発現上昇クローン)を2つの基準で選抜した(表 4-1). 選抜1は、'農2号'のLog ratio の平均値が1.0以上(ス テップ 1) かつ, 'とちおとめ'の Log ratio の平均値が 0.5 未満またはデータなし(ステップ2)とした. 選抜2 は、 '農2号'の Log ratio の3 反復のデータのうち2つ 以上が 1.0 以上 (ステップ 1) かつ, 'とちおとめ'の Log ratioの3反復のデータのうち2つ以上が0.5未満または データなし (ステップ 2) とした. ハイブリダイゼーシ ョン時に気泡が混入し、スライドの一部でシグナルが検 出されなかったことを考慮し、3 反復のデータのうち 2 つのデータで'農2号'が特異的に上昇したクローンを 選抜した.両選抜とも、ステップ3では重複クローンを 除去した. また, '農2号' では発現しているが 'とちお とめ'では発現していない遺伝子を検索対象に加えるた め、ステップ2の選抜基準にデータなしを加えた.

### 2-5-2 順化によって '農 2 号' 特異的に発現が低下する 遺伝子

cDNA マイクロアレイの結果から,順化によって'農 2 号'の発現が低下し'とちおとめ'では変わらないか 上昇する cDNA クローン(順化による'農2号'特異的 発現低下クローン)を,前項と同様に2つの基準で選抜

表 4-1 cDNA マイクロアレイ解析結果によるクローンの選抜基準('農2号'特異的発現上昇)

選抜	選抜基準
選抜1	
ステップ1	農2号の平均Log ratio ≧ 1
ステップ2	かつ,とちおとめの平均Log ratio < 0.5,またはデータなし
ステップ3	重複の除去
選抜2	
ステップ1	3反復中2データ以上の農2号のLog ratio ≧ 1
ステップ2	かつ, 3反復中2データ以上のとちおとめのLog ratio < 0.5, またはデータなし
ステップ3	重複の除去

Log ratio は Log<sub>2</sub> {(順化個体における転写産物蛍光強度の中央値-ローカルバックグランドの中央値) / (無菌 培養個体における転写産物蛍光強度の中央値-ローカルバックグランドの中央値)} によって算出した.

表 4-2 cDNA マイクロアレイ解析結果によるクローンの選抜基準('農2号'特異的発現低下)

選抜	選抜基準
選抜3	
ステップ1	農2号の平均Log ratio ≦ -1
ステップ2	かつ,とちおとめの平均Logratio > -0.5,またはデータなし
ステップ3	重複の除去
選抜4	
ステップ1	3反復中2データ以上の農2号のLog ratio ≦ -1
ステップ2	かつ, 3反復中2データ以上のとちおとめのLogratio > -0.5, またはデータなし
ステップ3	重複の除去

Log ratio は Log<sub>2</sub> { (順化個体における転写産物蛍光強度の中央値-ローカルバックグランドの中央値) / (無 菌培養個体における転写産物蛍光強度の中央値-ローカルバックグランドの中央値) } によって算出した.

した(表 4-2). 選抜3は、'農2号'のLog ratioの平均 値が-1.0以下(ステップ1)かつ、'とちおとめ'のLog ratio の平均値が-0.5 より大きいまたはデータなし(ステップ 2)とした. 選抜4は、'農2号'のLog ratioの3反復の データのうち2つ以上が-1.0以上(ステップ1)かつ、'と ちおとめ'のLog ratioの3反復のデータのうち2つ以上 が-0.5 より大きいまたはデータなし(ステップ2)とし た. 前項と同様に、ハイブリダイゼーション時の気泡混 入の影響を考慮した.また、ステップ3で重複クローン を除去し、ステップ2の選抜基準にデータなしを加えた.

#### 2-6 リアルタイム RT-PCR 解析

### 2-6-1 無菌培養個体と順化個体のリアルタイム PCR 解 析およびクローンの選抜

cDNA マイクロアレイ解析で選抜したクローンについ て,無菌培養個体と順化個体を供試し,第3章5-1-4 に 従ってリアルタイム RT-PCR 解析を行った.使用したプ ライマーの配列は別表1に示した.得られた結果はTukey 法による多重検定を行い,'農2号'順化個体の平均相対 発現量が'とちおとめ'無菌培養個体,順化個体および

・農2号、無菌培養個体と比較して有意差(P<0.05)が 認められた場合、そのクローンを選抜して以降の実験に 供試した。

### **2-6-2** 無菌培養個体と温室個体のリアルタイム PCR 解 析

前項で選抜したクローンのうち4クローンについて, 無菌培養個体と温室個体を供試し,第3章5-1-4に従っ てリアルタイム PCR 解析を行った.使用したプライマー の配列は別表1に示した.また,Tukey 法による多重検 定を行った.

### 2-7 cDNA クローンの BLAST 検索および塩基配列か らの機能推定

### 2-7-1 cDNAマイクロアレイにスポットしたクローンの BLAST 検索

cDNA マイクロアレイにスポットしたクローンは, CAP3 でクラスタリングされた EST 配列情報を用いて, NCBI の nr データベースに対し BLASTX 検索を行った. 検索条件は, Expect threshold を 10-5 に変更した.得ら れた結果から,最も高い E value を示した遺伝子の機能 を Definition とした.相同性が認められなかったクロー ンは No hit found とした.なお nr データベースは, NCBI の FTP サイト (ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/db/) からダ ウンロードした.

### 2-7-2 cDNA マイクロアレイで選抜したクローンの BLAST 検索

cDNA マイクロアレイで選抜したクローンは、最新の 情報に更新するため、CAP3でクラスタリングされたEST 配列情報を用いて、NCBI の nr データベースに対し BLASTX 検索を行った(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast. cgi). 検索条件は、Expect threshold を 10<sup>-5</sup>に変更した. 得られた結果から、機能が定義付けされている遺伝子で 最も高い E value を示した遺伝子の機能を Definition とし た. 相同性が認められなかったクローンは No hit found とした.

## 2-7-3 cDNA マイクロアレイで選抜したクローンの GO による機能分類

cDNA マイクロアレイで選抜したクローンは、CAP3 でクラスタリングされた EST 配列情報を用いて、TAIR の TAIR10 Proteins データベースに対し BLASTX 検索し (http://arabidopsis.org/Blast/index.jsp),シロイヌナズナ遺 伝子との相同性検索を行った.検索条件は、Expectation を 0.0001 に変更した.得られた結果から、最も高い E value を示した遺伝子の機能を Definition とした.相同性 が認められなかったクローンは No hit found とした. Definition が付いたクローンは、その遺伝子の AGI コー ドを TAIR の GO Annotations (http://arabidopsis.org/tools/ bulk/go/index.jsp; Berardini *et al.*, 2004) に入力して Functional categorization を行った.得られた Annotation count を,順化による'農2号'特異的発現上昇クローン と低下クローン間で比較した.

### 2-7-4 リアルタイム RT-PCR で選抜したクローンの代 謝地図上へのマッピング

リアルタイム RT-PCR 解析で選抜したクローンは, KEGGのgenes データベースに対して BLASTX 検索を行 った(http://blast.genome.jp/). その結果から, Pathway が 明らかになっており最も高い相同性を示す遺伝子を選び, その遺伝子の代謝地図上の位置に供試クローンを位置付 けた.

### 2-7-5 マイクロアレイにスポットしたクローンからの フラボノイド生合成関連遺伝子の選抜

本章 2-7-1 で行った BLASTX 検索の結果から,フラボ ノイド生合成に関与する遺伝子と 1E-50 以下の E value で相同性を示したクローンを,フラボノイド生合成関連 遺伝子として選抜した.

### 3 結果

### **3-1 cDNA マイクロアレイ解析によるクローンの** 選抜

3-1-1 順化による'農 2 号'特異的発現上昇クローン

'農2号'の順化3日個体は、無菌培養個体に対し有 意に発病度が低かったため(図 2-8), cDNA マイクロア レイ解析は無菌培養個体と順化3日個体の間で行った. 重複したクローンも含めた 8,711 スポットのうち, 解析 に供試したスポットは8,380 であった. 順化によって '農 2号'の発現が上昇し、'とちおとめ'では変化しないか 低下する cDNA クローン(順化による '農2号'特異的 発現上昇クローン)を2つの基準で選抜した(表 4-1). 各選抜基準のステップ1では、'農2号'を順化すると発 現が上昇するクローンを検索し、選抜1および2でそれ ぞれ 212, 194 クローンが選抜された. ステップ2では, その中から'とちおとめ'では変化がないか低下する, すなわち順化により'農2号'特異的に発現が上昇する クローンを検索し、それぞれ 21,30 遺伝子が選抜された. ステップ3で重複を除去すると、選抜1で選ばれたクロ ーンは18個, 選抜2は13個であり, 合計31クローンを 選抜した.

次に, 選抜された順化による'農2号'特異的発現上 昇クローン 31 個の EST 情報を用いて, NCBI の nr デー タベースに対する BLASTX 検索を行った. その結果, 26 クローンに相同性(E value≦1E-5)を示す遺伝子が認め られた(表 4-3). 選抜したクローンと相同性を示すタン パク質には、ストレス耐性に関わる Glutathione S-transferase (Conn et al., 2008), 耐病性に関連する Plastid lipid-associated protein CHRC (Leitner-Dagan et al., 2006), PR タンパク質の Bata-1,3-glucanase, フラボノイド合成に 関与する UDP-glucose glucosyltransferase, Anthocyanidin synthase, Dihydroflavonol 4-reductase, Cinnamate 4-hydroxylase, 転写因子である MADS-box protein, NAC domain-containing protein 等が認められた. また, 相同性 を示すタンパク質が認められないクローンが5個,機能 未知のタンパク質と相同性を示すクローンが3個認めら れた.

#### 3-1-2 順化による '農 2 号' 特異的発現低下クローン

順化によって'農2号'の発現が低下し,'とちおとめ' では変化しないか増加する cDNA クローンを2つの基準 で選抜した(表4-2).各選抜基準のステップ1では,'農 2号'を順化すると発現が低下するクローン(順化によ る (農2号)特異的発現低下クローン)を検索し,選抜

表 4-3	3	順化による	'農 2	号'	特異的発現上昇クロ・	ーンのアレイ	ſ解析および	BLASTX	検索結果
-------	---	-------	------	----	------------	--------	--------	--------	------

選抜	クローン名	Log ratio <sup>8</sup>	1	t検定	BLASTX検索結果 <sup>c</sup>		
		農2号	とちり	P値	Definition	Accession	E value
1	Stf019H06	1.24	0.34	0.045	Glutathione S-transferase	ABK81651	1E-80
	Stf031G10	1.21	0.31	0.194	Nucleoid DNA-binding protein cnd41 - like protein	BAF01928	2E-34
	Stg006A01	1.23	0.47	0.009	Glutathione S-transferase	ADC95628	4E-58
	Stg022H05	1.09	0.47	0.195	Plastid lipid associated protein CHRC	ABC42191	9E-61
	Stg027B04	1.61	-0.19	0.124	No hit found		
	Stg038H01	1.60	-	_	Transferase, transferring glycosyl groups	XP_002322080	6E-63
	Stg042B12	1.05	0.45	0.293	Beta-1,3-glucanase	AAL30426	1E-110
	Stg051C09	1.30	0.33	0.216	Conserved hypothetical protein	XP_002526960	3E-28
	Stg051D02	1.25	-0.32	0.077	No hit found		
	Str012A08	1.02	0.47	0.286	Carboxypeptidase type III	CAC86383	3E-131
	Str017G08	1.22	-	_	Pectinesterase inhibitor	BAC54964	6E-10
	Str021H07	1.41	0.30	0.215	UDP-glucose glucosyltransferase	AAU09442	4E-117
	Str031F12	1.12	—	—	Cysteine proteinase, putative	NP_566920	4E-29
	Str034F11	1.02	0.45	0.089	Anthocyanidin synthase	AAU12368	2E-82
	Str035B01	1.00	0.04	_	Pyruvate kinase, putative	XP_002513613	4E-100
	Str035F01	1.07	-1.68	0.097	BAG6 (BCL-2-ASSOCIATED ATHANOGENE 6);	NP_182147	7E-06
					calmodulin binding / protein binding		
	Str036B01	1.61	0.31	0.100	MADS-box protein	BAA90743	9E-133
	Str041A05	1.25	0.21	0.057	Serine-threonine protein kinase, plant-type, putative	XP_002522715	7E-47
2	Stg010A01	1.03	0.59	0.116	No hit found		
	Stg015E02	2.06	0.96	0.439	Dihydroflavonol 4-reductase	BAF96595	9E-80
	Stg017E04	0.68	0.44	_	Predicted protein	XP_002329002	8E-22
	Stg041A07	0.34	-0.48	0.442	Predicted protein	XP_002307325	6E-18
	Stg041E02	1.31	0.82	0.465	20S proteasome beta subunit PBG1	AAC32074	1E-87
	Stg045B01	0.41	0.44	0.971	Myo-inositol oxygenase	ACF04280	1E-66
	Stg047A07	1.17	0.70	0.535	Predicted protein	XP_002298572	4E-36
	Stg051G12	0.64	-0.88	0.146	Asparagine synthetase	AAC16325	4E-33
	Str008A11	1.58	0.51	0.025	HyPRP	AAD01800	2E-45
	Str013A01	1.55	0.63	0.098	NAC domain-containing protein	XP_002509421	4E-83
	Str026A12	1.02	0.53	0.086	No hit found		
	Str047C10	0.88	-1.90	0.100	No hit found		
	Suk015E12	1.59	0.72	0.376	Cinnamate 4-hydroxylase	ABI78932	2E-60

<sup>\*</sup>Log<sub>2</sub> {各スポットの(順化植物の蛍光強度中央値-ローカルバックグランドの中央値)/(無菌植物の蛍光強度中央値-ローカル バックグランドの中央値)}の3反復の平均値

<sup>b</sup> 'とちおとめ'を示す

°NCBIのnrデータベースを使用

3 および4 でそれぞれ 134, 132 クローンが選抜された. ステップ2 では、その中から'とちおとめ'では変化が ないか増加する、すなわち順化により'農2号'特異的 に発現が低下するクローンを検索し、それぞれ 15, 18 遺伝子が選抜された.その後、重複を除去すると選抜 3 で選ばれたクローンは 14 個,選抜4は6 個であり、合計 20 クローンを選抜した.

次に, 選抜された順化による '農 2 号'特異的発現低 下クローン 20 個の EST 情報を用いて, NCBI の nr デー タベースに対する BLASTX 検索を行った. その結果, 16 クローンに相同性 (E value  $\leq$  1E-5) を示す遺伝子が認め られた (表 4-4). 選抜したクローンと相同性を示すタン パク質には, Auxin-repressed protein (Reddy and Poovaiah, 1990), Putative beta-amylase, Lipid binding protein, putativeGermacrene-D synthase 等が認められた.また,相 同性を示すタンパク質が認められないクローンが4個, 機能未知のタンパク質と相同性を示すクローンが9個認 められた.

### 3-2 アレイ解析で選抜したクローンの GO による機能 分類

マイクロアレイ解析の結果選抜された,順化による'農 2号'特異的発現上昇クローン 31 個および低下クローン 20 個について, TAIR の TAIR10 Proteins データベースに 対し BLASTX 検索を行った. その結果,発現上昇 31 ク ローンのうち 26 クローンに,低下 20 クローンのうち 14 クローンに,相同性(E value≦1E-4)を示すシロイヌナ ズナ遺伝子が認められた.発現上昇クローンのうち

選抜 クローン名		Log ratio <sup>a</sup>		t検定	BLASTX検索結果 <sup>c</sup>		
		農2号	とち	- P値	Definition	Accession	E value
3	Stg005H10	-1.08	-0.30	0.098	Hypothetical protein	XP_002283457	2E-49
	Stg027A08	-1.04	-0.45	0.033	Hypothetical protein	XP_002271692	5E-49
	Stg031E03	-1.32	-0.31	0.076	SR33; RNA binding / protein binding	NP_001031195	6E-37
	Stg034D12	-1.18	-0.40	0.119	Auxin-repressed protein	AAA73872	8E-48
	Stg037B07	-1.07	0.31	0.057	Putative beta-amylase	CAB46051	7E-65
	Stg044E09	-1.27	-0.03	0.074	Lipid binding protein, putative	XP_002531954	3E-39
	Stg050E06	-1.01	-0.39	0.047	Hypothetical protein	XP_002274097	6E-40
	Stg051E07	-1.19	-0.49	0.156	Hypothetical protein	XP_002283457	8E-49
	Stg077B02	-1.15	-0.08	0.420	No hit found		
	Stl013B11	-1.08	0.35	0.055	Predicted protein	XP_002326690	6E-15
	Str004H11	-1.04	-0.48	0.086	Conserved hypothetical protein	CBL94180	2E-78
	Suk015C04	-1.26	-0.29	0.384	Hypothetical protein	CAN72109	3E-67
	Suk017G09	-1.10	-0.45	0.276	No hit found		
	Suk019F12	-1.45	-0.49	0.359	Germacrene-D synthase	AAX16121	1E-39
4	Stg008E12	-0.94	0.45	0.020	Predicted protein	XP_002326690	4E-53
	Stg029B01	-1.51	-0.59	0.154	Auxin-repressed protein	AAA73872	1E-46
	Stl005H07	-0.99	-0.43	0.314	Conserved hypothetical protein	XP_002514237	2E-34
	Suk018F07	-1.40	-0.54	0.074	No hit found		
	Sut004C12	-1.39	-0.74	0.471	No hit found		
	Sut014G12	-1.28	-0.62	0.071	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein	XP_002529044	6E-14

表 4-4 順化による '農 2 号' 特異的発現低下クローンのアレイ解析および BLASTX 検索結果

<sup>a</sup>Log<sub>2</sub> {各スポットの(順化個体の蛍光強度中央値-ローカルバックグランドの中央値)/(無菌培養個体の蛍光 強度中央値-ローカルバックグランドの中央値)}の3反復の平均値 <sup>b</sup> 'とちおとめ'を示す

27C, putative

<sup>°</sup>NCBIのnrデータベースを使用

Stg051C09 と Stg047A07 の 2 クローンは、同じ遺伝子 (AT3G01680:Mediator complex subunit Med28) と最も高 い相同性を示した. また発現低下クローンでは、 Stg034D12 と Stg029B013 が AT1G28330 (Dormancy -associated protein-like 1), Stg005H10 と Stg051E07 が AT1G68300 (Adenine nucleotide alpha hydrolases-like superfamily protein), Stg037B07, Stl013B11, Stg008E12 が AT4G17090 (Chloroplast beta-amylase) とそれぞれ同じ 遺伝子に最も高い相同性を示した (表 4-5, 表 4-6).

BLASTX 検索結果で最も高い相同性を示した遺伝子 の AGI 番号を用いて, TAIR の GOslim term に基づき機 能分類を行った. その結果,順化による'農2号'特異 的発現上昇クローンと相同性を示した遺伝子(上昇遺伝 子)の Molecular Function における Annotation Count の合 計は70,順化による'農2号'特異的発現低下クローン と相同性を示した遺伝子(低下遺伝子)の Annotation count の合計は15であった.上昇遺伝子の Annotation Count は, Transferase activityが14, Other enzyme activityが11, Hydrolase activityが8, Kinase activityが5で,酵素活性 を持つ遺伝子の合計が38で全体の54.3%となり,低下 遺伝子のそれぞれ0,3,1,0の合計4(26.7%)と比べ て多かった.また,Transcription factor activityは上昇遺伝 子のみ3(4.3%)で,低下遺伝子では該当がなかった. 一方,低下遺伝子ではUnknown molecular functionsの Annotation count が 5 (33.3%) と多かった (図 4-11)).
Biological Process の Annotationcount の合計は、上昇遺伝子の 211 に対して低下遺伝子は 63 であった.内訳は、上昇遺伝子の Developmental processes, Response to stress,
Cell organization and biogenesis がそれぞれ 20 (9.5%), 14 (6.6%) に対し、低下遺伝子のそれぞれ 1 (1.6%), 2 (3.2%), 1 (1.6%) と比べて多かった. 一方、低下遺伝子の Protein metabolism が 7 (11.1%),
Transcription, DNA-dependent が 3 (4.8%) に対して、上昇遺伝子はそれぞれ 11 (5.2%), 4 (1.9%) であった.
Other cellular processes, Other metabolic processes の上昇遺伝子はそれぞれ 59 (28.0%), 47 (22.3%), 低下遺伝子はそれぞれ 18 (28.6%), 20 (31.7%) と共に多かった.

Cellular Component の Annotation Count の合計は,上昇 遺伝子の 106 に対し低下遺伝子は 32 であった.上昇遺伝 子では Cytosol が 5 (4.7 %) であったが,低下遺伝子で は該当がなかった.また Nucleus の Anntation Count は上 昇遺伝子,低下遺伝子ともに7 であったが,構成比で比 較するとそれぞれ 6.6 %と 21.9 %であった. Other intracellular components, Other cytoplasmic components,

Chloroplast の上昇遺伝子はそれぞれ 21 (19.8%), 21 (19.8%), 14 (13.2%), 低下遺伝子はそれぞれ 6 (18.8%), 5 (15.6%), 5 (15.6%) と共に多かった (図 4-1 3)).

選抜	クローン名	BLASTX		
		Definition	AGIコード	E value
1	Stf019H06	Glutathione S-transferase phi 8	AT2G47730	5E-69
	Stf031G10	Eukaryotic aspartyl protease family protein	AT5G10770	1E-36
	Stg006A01	Glutathione S-transferase TAU 19	AT1G78380	8E-52
	Stg022H05	Fibrillin	AT4G04020	2E-60
	Stg027B04	No hit found		
	Stg038H01	Glycosyltransferase family 61 protein	AT3G18170	4E-62
	Stg042B12	Beta-1,3-glucanase 1	AT3G57270	2E-64
	Stg051C09	Mediator complex subunit Med28	AT3G01680	3E-16
	Stg051D02	No hit found		
	Str012A08	Serine carboxypeptidase-like 49	AT3G10410	1E-121
	Str017G08	Pectin methylesterase inhibitor 2	AT3G17220	1E-08
	Str021H07	UDP-glucosyl transferase 78D2	AT5G17050	2E-58
	Str031F12	Cysteine proteinases superfamily protein	AT3G49340	3E-31
	Str034F11	Leucoanthocyanidin dioxygenase	AT4G22880	1E-136
	Str035B01	Plastidic pyruvate kinase beta subunit 1	AT5G52920	5E-99
	Str035F01	BCL-2-associated athanogene 6	AT2G46240	4E-08
	Str036B01	K-box region and MADS-box transcription factor family protein	AT3G58780	3E-89
	Str041A05	S-locus lectin protein kinase family protein	AT4G03230	6E-05
2	Stg010A01	No hit found		
	Stg015E02	Dihydroflavonol 4-reductase	AT5G42800	2E-48
	Stg017E04	ROP-interactive CRIB motif-containing protein 4	AT5G16490	3E-08
	Stg041A07	AGAMOUS-like 16	AT3G57230	2E-06
	Stg041E02	20S proteasome beta subunit G1	AT1G56450	9E-90
	Stg045B01	Myo-inositol oxygenase 5	AT5G56640	8E-67
	Stg047A07	Mediator complex subunit Med28	AT3G01680	4E-19
	Stg051G12	Asparagine synthetase 2	AT5G65010	2E-28
	Str008A11	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin	AT1G62510	2E-37
		superfamily protein		
	Str013A01	NAC domain containing protein 10	AT1G28470	6E-73
	Str026A12	No hit found		
	Str047C10	No hit found		
	Suk015E12	Cinnamate-4-hydroxylase	AT2G30490	1E-52

表 4-5 順化による '農 2 号' 特異的発現上昇クローンのシロイヌナズナ遺伝子との BLASTX 検索結果

BLASTX 検索は, TAIR の TAIR10 Proteins データベースに対して行った.

### 表 4-6 順化による '農 2 号' 特異的発現低下クローンのシロイヌナズナ遺伝子との BLASTX 検索結果

選扳	クローン名	BLASTX検索結果		
		Definition	AGI No.	E value
3	Stg005H10	Adenine nucleotide alpha hydrolases-like superfamily protein	AT1G68300	4E-26
	Stg027A08	No hit found		
	Stg031E03	SC35-like splicing factor 33	AT1G55310	4E-39
	Stg034D12	Dormancy-associated protein-like 1	AT1G28330	4E-28
	Stg037B07	Chloroplast beta-amylase	AT4G17090	4E-67
	Stg044E09	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin	AT2G10940	1E-37
		superfamily protein		
	Stg050E06	Senescence associated gene 20	AT3G10985	5E-25
	Stg051E07	Adenine nucleotide alpha hydrolases-like superfamily protein	AT1G68300	3E-25
	Stg077B02	No hit found		
	Stl013B11	Chloroplast beta-amylase	AT4G17090	8E-12
	Str004H11	Drought-responsive family protein	AT3G06760	1E-49
	Suk015C04	Unknown protein	AT1G52320	2E-60
	Suk017G09	No hit found		
	Suk019F12	Terpenoid cyclases/Protein prenyltransferases superfamily protein	AT1G70080	9E-27
4	Stg008E12	Chloroplast beta-amylase	AT4G17090	6E-49
	Stg029B01	Dormancy-associated protein-like 1	AT1G28330	6E-28
	Stl005H07	Unknown protein	AT4G29110	6E-17
	Suk018F07	No hit found		
	Sut004C12	No hit found		
	Sut014G12	No hit found		

BLASTX 検索は, TAIR の TAIR10 Proteins データベースに対して行った.



上昇は、順化によって特異的に '農 2 号'の発現が上昇したクローンに、低下は特異的に低下したクローンに 相同性を示したアラドプシス遺伝子の Annotation Count を示した.

### 3-3 アレイ解析で選抜したクローンのリアルタイム RT-PCR 解析

3-3-1 順化による'農2号'特異的発現上昇クローン マイクロアレイ解析の結果選抜された順化による'農 2号'特異的発現上昇クローン31個について,リアルタ イム RT-PCR 解析を行った.作製したプライマー(別表) のうち7プライマーペアは,増幅が認められないか不安 定であったため,異なった部位に再設計したところ5プ ライマーが改善された.残り2プライマーのうち Stg051D02のプライマーは、、とちおとめ、では増幅したが、農2号、では増幅しなかった.さらにStr026A12は、、 とちおとめ、無菌培養個体および順化個体の平均相対 発現量が0.93および1.07であるのに対し、、農2号、無 菌培養個体および順化個体の発現量はそれぞれ0.0068、 0.0050と大幅に低かった(図4-24)).

各供試クローンの'とちおとめ'と'農2号'のそれ

ぞれ無菌培養個体と順化個体の相対発現量について, Tukey 法によって有意差を検定した.その結果, Stg038H01, Str021H07, Str034F11, Stg015E02 および Suk015E12 の 5 クローンは,他の処理と比較して'農 2 号'順化個体の発現量が有意に高かった(P < 0.05). Stg038H01 の'とちおとめ'無菌培養個体,順化個体,

\*農2号、無菌培養個体,順化個体の平均相対発現量は、
それぞれ1.71,2.05,5.61,22.22であった(図4-27)).
同様に,Str021H07は1.02,1.25,0.88,4.15および
Str034F11は0.90,2.64,1.17,7.02(図4-25)),Stg015E02は1.51,9.79,1.12,28.38(図4-27)),Suk015E12は1.18,1.66,1.06,2.95であった(図4-24)).これらの5クローンはリアルタイム RT-PCR 選抜クローンとし、以後の解析に供試した.

Str031F12 の '農 2 号'順化個体の平均相対発現量は 11.47 であり, '農 2 号'無菌培養個体の 3.85 とは有意差 が認められなかったものの, 'とちおとめ' 無菌培養個体 の1.62および順化個体の1.31と比較して有意に高かった (図 4-2 7)). Stg017E04 と Str013A01 は, '農2号' 順化 個体の平均相対発現量のそれぞれ 5.70, 4.74 に対し, 'と ちおとめ' 順化個体の 3.05, 2.33 で有意差が認められな かったものの, 'とちおとめ' 無菌培養個体の 0.99, 0.94,

・農2号'無菌培養個体の1.98, 1.01 はそれぞれ有意に 低かった(図4-25), 6)). さらに, Tukey 法によって有意 差は認められなかったものの, '農2号'順化個体の平均 相対発現量が,他の処理に対して高いクローンが2個認 められた. Str008A11 は '農2号'順化個体の平均相対 発現量の6.38 に対し, 'とちおとめ'無菌培養個体は2.04, 順化個体は3.22, '農2号'無菌培養個体は2.11 であっ た(図4-26)).同様に Stg047A07 は, 20.96 に対し1.16, 5.04, 3.56 であった(図4-27)).



#### 図 4-2 アレイ解析で選抜した遺伝子のリアルタイム RT-PCR 結果('農 2 号'特異的発現上昇)

相対発現量は、実験1回目の 'とちおとめ' 無菌培養個体を基準として算出した.実験は異なるサンプルを 用いて3回反復し、平均相対発現量を算出した.エラーバーは標準偏差を示す.とちは 'とちおとめ' を意味 する.無菌は無菌培養個体を、順化は順化個体を意味する.同一供試クローン中の同じアルファベットは、 Tukey 法で有意差がない (P<0.05) ことを示す.



図 4-2 続き



('農2号'特異的発現上昇,実験を3反復していないクローン)

#### 3-3-2 順化による '農 2 号' 特異的発現低下クローン

マイクロアレイ解析の結果選抜された,順化による'農 2号'順化特異的発現低下クローン 20 個について,リア ルタイム RT-PCR 解析を行った.作製したプライマー(別 表 1) のうち4 プライマーペアは,増幅が不安定であっ たため異なった部位に再設計したところ,2 プライマー は改善された.しかし,Suk017G09 および Suk019F12 を 増幅するプライマーは,'農2号'では増幅したが'とち おとめ'では増幅しなかった.

各供試クローンの 'とちおとめ' と '農2号' のそれ ぞれ無菌培養個体と順化個体の相対発現量について, Tukey 法によって有意差を検定した.その結果, Stg027A08の '農2号'順化個体の平均相対発現量 0.50 は、 'とちおとめ'無菌培養個体の 0.95、順化個体の 0.75 および '農2号'無菌培養個体の 0.97 と比較して有意に 低かった (P<0.05) (図 4-4 1)).そのため、リアルタイ ム RT-PCR 選抜クローンとし、以後の解析に供試した.

Suk018F07 の '農 2 号'順化個体の平均相対発現量は 0.39 であり, 'とちおとめ'順化個体の 0.73 とは有意差 が認められなかったものの, 'とちおとめ'無菌培養個体 の 1.14 および '農 2 号'無菌培養個体の 0.96 と比較して 有意に低かった (図 4-4 3)).







### 図 4-4 アレイ解析で選抜した遺伝子のリアルタイム RT-PCR 結果 ( '農 2 号' 特異的発現低下)

相対発現量は、実験1回目の 'とちおとめ'無菌培養個体を基準とし て算出した.実験は異なるサンプルを用いて3回反復し、平均相対発現 量を算出した.エラーバーは標準偏差を示す.とちは 'とちおとめ'を 意味する.無菌は無菌培養個体を,順化は順化個体を意味する.同一供 試クローン中の同じアルファベットは、Tukey 法で有意差がない (P < 0.05) ことを示す.


相対発現量は、実験1回目の'とちおとめ' 無菌培養個体を基準として算出した.実験は, 異なるサンプルを用いて2回反復し, 平均相対 発現量を算出した. エラーバーは標準偏差を示 す. とちは 'とちおとめ' を意味する. 無菌は 無菌培養個体を,順化は順化個体を意味する.



# 3-4 リアルタイム RT-PCR で選抜されたクローンの代 謝地図上へのマッピング

リアルタイム RT-PCR によって選抜された, 順化によ る '農 2 号' 特異的発現上昇クローンの Stg038H01, Str021H07, Str034F11, Stg015E02, Suk015E12の5クロ ーンおよび,順化による '農2号'特異的発現低下クロ ーンの Stg027A08 について, KEGG genes データベース に対して BLASTX 検索を行い,得られた相同遺伝子から 代謝地図上の位置を推定した. その結果, Suk015E12 は C4H に相同性を示し Phenylalanine metabolism,

Phenylpropanoid biosynthesis, Flavonoid biosynthesis 経路 に位置付けられた. Stg015E02 および Str034F11 はそれぞ れ DFR および ANS に相同性を示し Flavonoid biosynthesis 経路に, Str021H07 は 3-GT に相同性を示し Anthocyanin biosynthesis 経路に位置付けられた. Stg038H01 および Stg027A08 は, それぞれ Glycosyltransferase, putative およ び Homeobox-leucine zipper protein HAT5-like と相同性を 示したが、代謝地図上への位置付けはできなかった(表 4-7).

表 4-7 順化による '農 2 号' 特異的発現クローンの KEGG における BLASTX 検索結果

クローン名	Definition	Entry	e-value	Pathway	
順化による'農2号'特異的発現上昇クローン					
Suk015E12	Cinnamate 4-hydroxylase, putative	rcu:RCOM_1164350	3E-53	rcu00360	Phenylalanine metabolism
	(C4H)			rcu00940	Phenylpropanoid biosynthesis
				rcu00941	Flavonoid biosynthesis
Stg015E02	Dihydroflavonol reductase (DFR)	vvi:100233141	5E-56	vvi00941	Flavonoid biosynthesis
Str034F11	Leucoanthocyanidin dioxygenase	vvi:100233142	1E-137	vvi00941	Flavonoid biosynthesis
	(LDOX, ANS)				
Str021H07	UDP-glucosyltransferase, putative	rcu:RCOM_1324500	4E-66	rcu00942	Anthocyanin biosynthesis
	(Anthocyanidin 3-O-				
	glucosyltransferase: 3-GT)				
Stg038H01	Glycosyltransferase, putative	mtr:MTR_8g106640	1E-62		
順化による'農2号'特異的発現低下クローン					
Stg027A08	Homeobox-leucine zipper protein	vvi:100260419	6E-44		
	HAT5-like				

# 3-5 マイクロアレイにスポットした cDNA クローンから のフラボノイド生合成関連遺伝子の選抜

リアルタイム RT-PCR によって, 順化による'農2号' 順化個体特異的高発現クローンとして選抜された5クロ ーンのうち、4 クローンがフラボノイド生合成に関連す る遺伝子と推定された. そこで、マイクロアレイにスポ

ットされている cDNA クローンの中から,フラボノイド 生合成に関与すると推定されるクローンを検索した. そ の結果, Phenylalanine から anthocyanin までの生合成を触 媒すると推定される 10 酵素 (PAL から 3-GT まで)と, そこから分岐する反応を触媒すると推定される 3 酵素 (FLS, LAR および ANR) について, 各酵素それぞれ1

~3 個の非重複クローン計 23 個が選抜された.それらの クローンのうち、 '農 2 号'を順化することで唯一 Stg047F08 (ANR)の発現が 0.84 倍 (Log ratio = -0.24) に 低下したが、他のクローンは全て上昇していた.上昇幅 が小さかったクローンは、PAL と推定された Suk013C06 (1.86 倍: Log ratio = 0.89), 4CL と推定された Stg008A06 (1.44 倍: Log ratio = 0.52), Stg027F02 (1.28 倍: Log ratio = 0.36), CHS と推定された Stf001H10 (1.08 倍: Log ratio = 0.11) であり、他の 18 クローンは順化することで 2 倍 (Log ratio = 1.0) 以上に発現が上昇した.また PAL, CHS, ANR は、同じ遺伝子と推定された他のクローンの発現が 2 倍以上に上昇していた.一方 'とちおとめ'は、2 倍以 上上昇したクローンは 11 個であった. '農 2 号'と 'と ちおとめ'の Log ratio を比較すると、Stg008A06 (*4CL* と推定)、Stg002C01 (*FLS* と推定) および Stg047F08 (*ANR* と推定)の3クローンは 'とちおとめ'が高い値を示し たが、その他の 20 クローンは '農 2 号'が高い値を示し た (図 4-6). なお、これらの 10 遺伝子 23 クローンの塩 基配列は DDBJ に登録した (AB646321- AB646328, AB646330 - AB646345).



**図 4-6 cDNA マイクロアレイにスポットされたフラボノイド生合成に関連すると推定されるクローンのアレイ解析結果** ボックスの数字と網掛けの色は、平均 Log rathio (3 反復実験の Log ratio の平均値) の値を示す. Log ratio は Log<sub>2</sub> {(順化 個体蛍光強度の中央値-ローカルバックグランドの中央値) / (無菌培養個体の蛍光強度の中央値-ローカルバックグラン ド)} の値を示す. 左側のボックスは '農 2 号', 右側は 'とちおとめ'の値を示す. 青で網掛けしたクローンは, リアルタ イム RT-PCR で選抜されたクローンを示す. PAL: Phenylalanine ammonia-lyase, C4H: Cinnamate-4-hydroxylase, 4CL: 4-coumarate-CoA ligase, CHS: Chalcone synthase, CHI: Chalcone isomerase, F3H: Flavanone 3-hydroxylase, F3'H: Flavonoid 3'-hydroxylase, DFR: Dihydroflavanol 4-reductase, ANS: Anthocyanidin synthase, 3-GT: Anthocyanidin 3-O-glucosyltransferas, LAR: Leucoanthocyanidin reductase, ANR: Anthocyanidin reductase

# 3-6 フラボノイド生合成関連遺伝子の温室個体にお けるリアルタイム RT-PCR 解析

フラボノイド生合成に関与すると推定される4クローンについて、 (農2号) および 'とちおとめ'の温室個体のリアルタイム RT-PCR 解析を行い、両品種の無菌培養 個体の平均相対発現量と比較した.その結果、Str021H07 (3-GTと推定)の 'とちおとめ'無菌培養個体、温室個 体、 (農2号) 無菌培養個体、温室個体の平均相対発現量 は、それぞれ1.21、1.31、1.03、4.68 であり、 (農2号) 温室個体が有意に高かった(Tukeyの多重検定:P<0.05). 同様に、Suk015E12(C4Hと推定)はそれぞれ1.25、14.48、 1.14、39.92、Stg015E02(DFRと推定)はそれぞれ1.33、 58.72, 0.98, 228.24 であった. これら 2 クローンの '農 2 号'温室個体の平均相対発現量は, 'とちおとめ'温室 個体と有意差は無かったが明らかに高く, 両品種の無菌 培養個体より有意に高かった. また, Str034F11 (ANS と 推定) はそれぞれ 1.61, 11.95, 2.09, 76.67 であり, 有意 差が無かったものの '農 2 号'温室個体は他のサンプル と比較して高い値を示した (図 4-7).

また '農 2 号'温室個体の相対遺伝子発現量は,本章 3-3-1 の順化を 3 日間行った個体の平均相対発現量と比 較すると, Str021H07 は同レベルであるものの,その他 の 3 クローンは温室個体でより高かった.



図 4-7 ノブハノ1ト生 言 成 遺伝 ナの 温 至 104 におり るりアルタイム RT-PGR 結果 相対発現量は、実験1回目の'とちおとめ'無菌培養個体を基準として算出した.実験は異なるサンプルを用いて 3 回反復し、平均相対発現量を算出した.エラーバーは標準偏差を示す.同一供試クローン中の同じアルファベットは、 Tukey の多重検定で有意差がない(P<0.05)ことを示す.

## 4 考察

# 4-1 cDNA マイクロアレイを用いた順化による耐病性向上に関連する遺伝子の検索

(農2号)に炭疽病菌を接種すると、斑点型病斑を形成するが通常枯死しない.しかし第2章で、無菌培養個体は炭疽病菌を接種すると枯死することを明らかにした.この結果は、無菌状態の (農2号)が本来の耐病性を発現していないことを示唆する.すなわち、(農2号)の無菌培養個体は耐病性に関与する遺伝子の発現が抑制されているか、耐病性を抑制する(感受性を促進する)遺伝子が強く発現している状態が想定される.そして、無菌培養個体を順化した後に炭疽病菌を接種すると、順化期間が長くなるにつれ発病度が低下し、順化の過程で耐病

性が向上することが明らかとなった.この結果から,順 化の過程で耐病性に関与する遺伝子の発現が上昇する, または耐病性を抑制する遺伝子の発現が抑制されること が予想される.シロイヌナズナにおいて ABA を処理す ると,SAを介して誘導される SAR が抑制される.これ は植物体が不良環境にさらされた時,ABA 生合成経路遺 伝子の発現が活性化して耐ストレス性を発揮するが, SAR に関連する遺伝子の発現上昇が抑制され,耐病性が 低下するためである(Yasuda et al., 2008).この報告は, 無菌培養条件下における '農2号'の罹病化が,ある遺 伝子(群)の発現抑制によって起こる可能性を示唆する と考えられた.さらに,シロイヌナズナの edrl 変異体は うどんこ病(原因菌: Erysiphe cichoracearum)に対して 耐病性を示し,EDR1 は SA 応答経路による耐病性を負 に制御することが示唆されている(Frye et al., 2001).こ れは、ある耐病性を抑制する遺伝子が変異することによ って耐病性を獲得した例である.遺伝子によっては、環 境条件の変化で発現が大きく変動することもあり、無菌 培養条件下における'農2号'の耐病性抑制遺伝子が順 化によって発現しなくなり、耐病性が向上する可能性も 十分に考えられる.

そこで, '農2号'の無菌培養個体は耐病性遺伝子の発 現が抑制されており, 順化の過程で遺伝子発現が上昇す ると仮定し, '農2号'の順化による耐病性向上に関与す る遺伝子を検索した. さらに, '農2号'の無菌培養個体 は耐病性抑制遺伝子が発現しており, 順化の過程で遺伝 子発現が抑制されると仮定し, '農2号'無菌培養時の耐 病性抑制に関与する遺伝子を検索した. 具体的には, '農 2号'と 'とちおとめ'を用いて, 無菌培養個体と順化 個体間の遺伝子発現パターンについて, cDNA マイクロ アレイ解析を行った. 得られた結果から, 順化によって

・農2号'の発現が上昇し、'とちおとめ'では変わらないか低下する cDNA クローン (順化による'農2号'特異的発現上昇クローン)および、順化によって'農2号'の発現が低下し、'とちおとめ'では変わらないか上昇する cDNA クローン (順化による'農2号'特異的発現低下クローン)を選抜した.

順化による '農2号'特異的発現上昇クローンには, フラボノイド生合成に関与する UDP-glucose glucosyltransferase , Anthocyanidin synthase , Dihydroflavonol 4-reductase, Cinnamate 4-hydroxylase が含 まれていた. ソルガムでは, Cochliobolus sublineolum に 対する耐病性にフラボノイドファイトアレキシン 3-deoxyanthocyanidins の蓄積が必要であり、変異体の解 析によって MYB 転写因子の yellow seedl によって制御さ れることが明らかになっている(Ibraheem et al., 2010). また、イネの Sakuranetin やソルガムの Apigeninidin 等の ファイトアレキシンもフラボノイドに含まれる(Aida et al., 1996). さらに, 豆類の多くのイソフラボノイド系フ アイトアレキシン (Liu et al., 2006; Zimmermann et al., 2010)は、フラボノイド生合成経路から派生する、ファ イトアレキシンは植物種によって特異的に産生されるた め、フラボノイド生合成経路が活性化されていることを イチゴにおける耐病性に直接関連付けられないが、とて

も興味深い結果である. さらに,様々なストレス耐性に 関与する Glutathione S-transferase (Dixon and Edwards, 2010) と相同性を示すクローンが2個含まれていた.本 実験では,培土を詰めた無菌状態の培養ビン中で育てた 植物を供試し、ビンのフタを解放することで順化を行っ た.そのため、順化中には乾燥ストレスを受けているこ とが想定され、品種によって耐性が異なり結果として遺 伝子発現が異なっている可能性が示唆される.また、2 クローンのうち一方のクローンは、ブドウにおけるアン トシアニンのサイトゾルから液胞へのトランスポーター と推定されている遺伝子(Accession No.: ABK81651, Conn et al., 2008)と高い相同性(E value = 1E-80)を示し た.そのため、フラボノイド生合成経路に属すると推定 される遺伝子とその代謝産物との関連に興味が持たれる. 順化による '農2号'特異的発現上昇クローンには、耐 病性に関連する可能性を示唆する遺伝子が多く含まれて おり、'農2号'順化特異的発現低下クローンと傾向が異 なると思われたため、それぞれで選抜されたクローンの GOによる機能分類を試みた.

農2号'順化特異的発現上昇クローンと相同性が認め られるシロイヌナズナ遺伝子(上昇遺伝子:26遺伝子) と、、"農2号"順化特異的発現低下クローンと相同性が認 められるシロイヌナズナ遺伝子(低下遺伝子:14遺伝子) のそれぞれについて、GO slim term に基づき機能分類を 行った (図 4-1). Molecular Function による分類では、上 昇遺伝子は Transferase activity や Hydrolase activity 等の酵 素活性を持つ遺伝子が多く認められ, Transcription factor activity は上昇遺伝子でのみ認められた. つまり、'農 2 号'と 'とちおとめ'間でそれぞれ順化によって発現変 動する遺伝子を比較すると、'農2号'でのみ発現上昇し た遺伝子は酵素活性や転写因子活性を持つものが多いと 言える. 同様に Biological Process による分類では、 '農 2 号'でのみ発現上昇する遺伝子は Developmental processes, Response to stress および Cell organization and biogenesis に 関与するものが多く,低下する遺伝子は Protein metabolism と Transcription, DNA-dependent に関与するも のが多いと言える、培養ビン中の植物を順化することは, 無菌で湿度の高い状態から多くの微生物との接触や乾燥 のストレスに曝されることを意味するため、植物体内の 様々な生理活性を高めることによって対応していること が想像される.つまり,順化による'農2号'の遺伝子 発現の変動は、少なくともある部分では'とちおとめ' と比べてより植物体の生理活性を高めている可能性を示 唆しており,耐病性の向上に寄与することが期待される. 一方で, 上昇する遺伝子, 低下する遺伝子ともに機能未 知のものが多いため,更に詳細な解析が必要と考えられ た.

# 4-2 アレイ解析で選抜したクローンのリアルタイム RT-PCR 解析

マイクロアレイ解析で選抜した,順化による'農2号' 特異的発現上昇クローン31個と,順化による'農2号' 特異的発現低下クローン20個の計51クローンについて, リアルタイム RT-PCR 解析を行った.この解析では,'農 2号'と'とちおとめ'でそれぞれ無菌培養個体と順化 個体の相対発現量を比較し,'農2号'順化個体が他の処 理と有意差(Tukey法:P<0.05)が認められたクローン を選抜した.その結果,Stg038H01(図4-27)), Str021H07, Str034F11(図4-25)), Stg015E02(図4-27)), Suk015E12

(図 4-2 4))の5クローンは、他の処理と比較して'農2 号'順化個体の発現量が有意に高かった.同様に、 Stg027A08 (図 4-4 1))は、他の処理と比較して'農2号' 順化個体の発現量が有意に低かった.

リアルタイム RT-PCR 解析で得られた '農 2 号'順化 個体特異的に高発現または低発現の6クローンについて, KEGG genes データベースに対して BLASTX 検索を行い, 得られた相同遺伝子から代謝地図上の位置を推定した. その結果, '農 2 号'順化個体で特異的に高発現する 5 クローンのうち 4 クローン (Suk015E12: C4H, Stg015E02: DFR, Str034F11: ANS, Str021H07: 3-GT) が, Flavonoid biosynthesis 経路またはその下流に位置する Anthocyanin biosynthesis 経路またはその下流に位置する Anthocyanin biosynthesis 経路に位置付けられ (図 4-6), フラボノイド生合成経路が活性化されていることが示唆 された. そのため,マイクロアレイ上に他のフラボノイ ド生合成に関与するクローンがスポットされているのか, スポットされている場合,それらのクローンのアレイ解 析データを再検証することが必要と考えられた.

# 4-3 フラボノイド生合成に関与すると推定されるクロ ーンのアレイ解析データの再検証

マイクロアレイにスポットされているクローンから, フラボノイド生合成に関与すると推定されるクローンを 検索した.その結果,13 酵素23クローンがスポットさ れていることが明らかとなり(図4-6),フェニルアラニ ンからアントシニンまでのフラボノイド生合成を触媒す る酵素遺伝子の発現がモニタリング可能と考えられた. それらクローンのアレイ解析結果は、両品種とも順化に よってフラボノイド生合成経路全体が活性化されており、 特に炭疽病耐病性の'農2号'でより高い発現上昇を示 していた.ただし、4CLと推定される2クローンの発現 は、一方は順化による変動は小さく、もう一方は'農2 号'より'とちおとめ'の方が大きく上昇している.こ の結果は、、農2号'の発現上昇が'とちおとめ'と比較 して大きいという他遺伝子の発現パターンとは異なり, 4CLが '農2号'代謝経路のボトルネックになっている ように見える (図4-6).もしかしたら,この発現量で十 分に機能を発揮するのかもしれないし,'とちおとめ'の 遺伝子と入れ替えると更に耐病性が増すかもしれない. また,他に相同遺伝子があり,その遺伝子の発現が大き く上昇している可能性もある.

イチゴは果色がアントシアニン含量に大きく影響を受 けるため (Yoshida et al., 2002), フラボノイド代謝経路に 関する研究は果実を対象としたものが多い(Hoffmann et al., 2006 ; Lunkenbein et al., 2006 ; Griesser et al., 2008a; Griesser et al., 2008b; Salvatierra et al., 2010). 一方で, 植 物においてはフラボノイド生合成の重要な遺伝子である CHS 遺伝子の発現と耐病性の関連を示す報告は多い. Medicago truncatula にその病原菌 C. trifolii を接種すると, 感受性系統より耐病性系統で CHS 遺伝子の発現が早く, 強く上昇する (Jaulneau et al. 2010). また, うどんこ病に 対する耐病性が誘導されたキュウリでは、CHS の転写阻 害剤である Cvcloheximide を処理することで耐病性の誘 導が抑制される (Fofana et al. 2005). これらの結果は, フラボノイド生合成経路の活性化が耐病性に関与するこ とを示唆している.また、多くの植物種で生物、非生物 のストレスに対する耐性や、ファイトアレキシン、ファ イトアンティシピンの産生にフラボノイド生合成経路が 関与している (Dao et al., 2011). さらに, Frost grape (Vitis riparia)の STS 遺伝子をイチゴに形質転換すると、特に 古い葉で STS 遺伝子の発現が上昇する一方で, CHS 遺伝 子の発現が抑制される. その結果, フラボノール誘導体 含量が減少して灰色カビ病菌に対する感受性が高まって いる (Hanhineva et al. 2009). これらの現象は、フラボノ イド生合成経路の活性化がイチゴの耐病性の重要な要因 であることを示唆していると考えられる.

PAL はフェニルアラニンを基質としてケイ皮酸とアン モニアを生成し、フラボノイドだけでなくリグニンを含 めたフェニルプロパノイド、SA 等の生合成の起点とな る酵素である.オオムギでは、PAL やリグニン合成に重 要な CAD を阻害するとさび病菌に対する侵入抵抗性が 弱まり、耐病性におけるフェノール物質やリグニンの役 割が示唆されている (Prats et al., 2007).シロイヌナズナ では、非親和性のべと病菌を接種すると相互作用で細胞 にリグニン化が起こる.CAD を阻害するとリグニン化は 起こらないが、PAL を阻害した時ほどの感受性にはなら ない.これは CAD を阻害しても SA の蓄積が起こるため で、リグニン化も耐病性には寄与するが、中心的な役割 を担うのは SA であるという証拠となる (Mauch-Mani and Slusarenko,1996). 一方 '農 2 号'を順化すると, PAL 遺 伝子と推定されたクローンのうち 3 倍以上(Log rathio = 1.61)に上昇しているものがあり,フラボノイド生合成 経路以外の経路の活性化にも興味が持たれる. SA 経路 については,第 3 章の結果から強く活性化されている証 拠は得られていない.リグニンの合成については,無菌 培養個体と順化個体を比較したアレイ解析の結果で,'農 2 号', 'とちおとめ'ともに CAD と推定されるクローン の発現は変動していなかった(データ未掲載).さらに CHS 遺伝子より下流の遺伝子で,順化による発現の上昇 傾向がより強いため,フラボノイド生合成経路の活性化 が炭疽病耐病性の中心である可能性が高いと考えられる.

また,温室個体のリアルタイム RT-PCR 結果から,通 常の栽培のイチゴ個体においても'農2号'は'とちお とめ'に比較して,フラボノイド生合成に関与する C4H, DFR, ANS および 3-GT と推定される酵素遺伝子の発現 が高いことが明らかとなった(図 4-7).この結果から, 順化によって活性化された'農2号'のフラボノイド生 合成経路は,そのまま'とちおとめ'と比較して高い状 態が維持されることが示唆された.今後は,各遺伝子の 詳細な発現解析に加えて機能解析を行い,耐病性との関 連性を明らかにすることが課題と考えられる.

# 第5章 遺伝子発現抑制を用いたイチゴ における遺伝子機能解析法の検討

## 1 序論

第4章で、"農2号"の順化による耐病性の向上に、フ ラボノイド生合成経路の活性化が関与している可能性を 示唆した.本章ではそれを検証するために、イチゴにお ける効率的な遺伝子機能解析法の確立を目指した.

栃木農試ではイチゴ2倍体野生種を用いた形質転換法 を確立しており、イチゴ栽培種遺伝子の機能解析を行っ ている.しかし、葉片にアグロバクテリウムを感染させ て再分化個体を得る現在の方法は、多くの労力と時間を 要するため、多数の遺伝子を解析するには更に効率的な 手法の開発が必要となる. イチゴにおける効率的な遺伝 子機能解析法として、RNAiベクターを用いた CHS 遺伝 子の発現抑制を、アグロインフィルトレーションにより 果実で行っている報告がある (Hoffmann et al., 2006). そ こで、この方法を'農2号'の炭疽病耐病性に関する遺 伝子機能解析に用いることを考えた.炭疽病菌を '農 2 号'と'とちおとめ'に接種すると、病斑の大きさは異 なるものの葉身においては両品種とも病原菌を封じ込め る.一方, '農2号'の葉柄は斑点型病斑で炭疽病菌を封 じ込めるが、 'とちおとめ' 葉柄の病斑は進展して葉柄折 損を起こす.そこで、両品種の葉柄を供試材料とした. また Hoffmann et al. (2006)の報告では、遺伝子発現抑 制効果が処理した果実によって一定でないため、より安 定性の高いウイルスベクターによる発現抑制についても 検討した.

現在,多くの植物ウイルスがベクター化され様々な植 物種で利用されており,大規模な遺伝子スクリーニング に用いられた報告もある(山岸・吉川,2010).イチゴに おいてもウイルスベクターによる発現抑制ができれば, 遺伝子機能解析に有効と考えられる.イチゴの主なウイ ルスは SMYEV, SMoV, SVBV, SCrV の4種類であり, 現在の栽培品種では重複感染しなければ病徴が現れない

(Martin and Tzanetakis, 2006). そのため, ウイルスベク ターによる発現抑制で遺伝子機能解析を行うには都合が 良い. さらに SMYEV は, イチゴ内在性遺伝子の発現抑 制効果は未確認であるものの, ベクター化が完了してい る (高村, 2010). そこで, SMYEV ベクターを用いたイ チゴにおける遺伝子発現抑制技術の確立を目指した.

# 2 アグロインフィルトレーションによる遺伝子 機能解析法の検討

#### 2-1 葉柄を用いた炭疽病耐病性検定

#### 2-1-1 材料および方法

(1) 供試植物

供試植物は、ガラス温室で94日間育苗した'農2号' と'とちおとめ'のランナー苗および無菌培養個体(移 植後48日間)を用いた.無菌培養個体は、第2章3-1-1 にしたがって作製した.順化は、無菌培養個体を液肥(大 塚ハウス1号600 mg/l、大塚ハウス2号400 mg/l、大塚 ハウス5号10 mg/l;大塚アグリテクノ)入りのバット に移植し、22℃・14時間日長のインキュベーターで行い、 49日後に試験に供試した.

#### (2) 葉柄の調製

病原菌の接種に供試する葉柄は、展開し終わった最上 位葉および第3葉の葉柄を用いた.クラウン部および葉 身から葉柄を切り離し,葉身側の約4cmを病原菌接種に 供試した.なお,葉柄が4cm未満の場合は、そのまま全 長を供試した.

#### (3) 病原菌の接種

85 mm ろ紙を1枚入れて滅菌した9 cm シャーレに滅 菌純水2 ml 加えた後, 調製した葉柄をろ紙の上に置いた. イチゴ炭疽病菌の接種は, マイクロピペットを用いて1 葉柄あたり接種源1  $\mu$ lを4か所滴下接種した(図5-1). 接種源は第2章2-1-2にしたがって作製したが,分生子 密度は5×10<sup>5</sup>個/ml に変更した.また,各処理とも5葉 柄を供試した.

#### (4) 発病調査

ランナー苗の葉柄および順化苗の葉柄を入れたシャー レは、25℃・14時間日長のインキュベーターで静置した. ランナー苗の葉柄は、炭疽病菌接種3,6,9,12,16日 後に発病調査を行った.順化苗の葉柄は、炭疽病菌接種 3,6,13日後に発病調査を行った.発病調査は、各葉柄 に接種した場所ごとに、発病指数0:無病徴、1:病斑直 径が2 mm以下、2:病斑直径が2 mmより大きい、3: 病斑直径が2 mmより大きくかつ2個以上の病斑が融合、 4:供試した葉柄全長が褐変の基準で行った(図 5-2). なお、病斑の形成が認められなかった接種場所に、隣の 病斑が拡大した場合も病斑が融合したと見なした.各処 理とも5葉柄ずつ供試した.各葉柄の接種場所4か所の 発病指数の平均、さらに5葉柄の平均発病指数および標 準誤差を下記の計算式で算出した.得られた結果から、同じ処理の 'とちおとめ' と '農2号' 間でt検定を行った.

各葉柄の発病指数の平均=Σ(発病指数×接種か所数) /各葉柄の接種か所数 平均発病指数=Σ(各葉柄の発病指数の平均×葉柄数) /供試葉柄数

標準誤差=√{∑(各葉柄の発病指数の平均-平均発病 指数)<sup>2</sup>/(供試葉柄数-1)}/√供試葉柄数



図 5-1 イチゴ葉柄を用いた炭疽病菌接種の様子 胞子懸濁液の菌密度は 5×10<sup>5</sup> 個/ml に調製し,1葉柄当たり1μl を4か所滴下接種した. 葉柄は, 葉身側の約4cm を供試した. 拡大図中のバーは2mm を示す.





図 5-2 イチゴ葉柄を用いた炭疽病耐病性検定における発病指数 発病指数は、0:病徴なし、1:病斑直径が2mm以下、2:病斑直径2mmより大きい、3:病 斑直径が2mmより大きいかつ2個以上の病斑が融合、4:葉柄の全長が褐変とした.発病指数

#### 2-1-2 結果

葉柄を用いたアグロインフィルトレーションによる遺 伝子機能解析法を確立するため,葉柄における炭疽病耐 病性検定法を検討した.ランナー苗の葉柄に炭疽病菌を 接種した結果,'農2号'最上位葉柄の平均発病指数は,

2の病斑の下のバーは, 2mm を示す.

炭疽病菌接種6日後が0.05,9日後以降は0.10と低い値 で推移した.一方 'とちおとめ'最上位葉柄は,接種3 日後に0.50,6日後に1.20,9日後2.30,12日後3.50と 徐々に病徴が進行し,16日後には4.00と供試全葉柄の全 長が褐変した(図5-3 a).各調査日ごとに'農2号'と 'とちおとめ'間でt検定を行ったところ,接種6日後 を除いて有意差が認められ (P>0.05),特に接種12日後 および16日後は1%水準で有意だった.第3葉柄の平均 発病指数は, '農2号'では接種16日後まで全く褐変が 認められなかった. 'とちおとめ'においても接種16日 後で0.50であり (図5-3a),褐変は進まず有意差も認め られなかった.

順化苗の葉柄を炭疽病耐病性検定に供試すると, '農 2 号'最上位葉柄の平均発病指数は, 接種 3 日後に 0.40 と なり 13 日後まで 0.40 と一定であった. 'とちおとめ'最 上位葉柄は, 接種3日後に0.90,6日後に3.25と急激に 褐変が拡大し,13日後は4.00と全葉柄が褐変した(図 5-3b).またt検定の結果,接種3日後は有意差が認めら れなかったが,6日後および13日後は有意差が認められ た(P>0.01). '農2号'の第3葉柄は,接種3日後には 0.10,6日後および13日後が0.15であったのに対し,'と ちおとめ'は接種3日後の0.30,6日後の2.20,13日後 の4.00と褐変が進行した(図5-3b).t検定の結果,接 種13日後は'農2号'の平均発病指数が有意に低かった (P>0.01).



図 5-3 イチゴ葉柄を用いた炭疽病耐病性検定の結果

a: ランナー苗葉柄を用いた平均発病指数の推移.b: 順化苗葉柄を用いた平均発病指数の推移. 胞子懸濁液の菌密度は5×10<sup>5</sup>個に調製し,1葉柄当たり1µlを4か所滴下接種した.各処理とも 5葉柄を供試した.エラーバーは標準誤差を示す.

## 2-2 葉柄におけるアグロインフィルトレーション法の 検討

#### 2-2-1 材料および方法

(1) 供試植物および葉柄の調製

供試植物は、'農2号'と'とちおとめ'の無菌培養個体 (移植後54日間)を用いた.無菌培養個体は、第2章 3-1-1にしたがって作製した.順化は培養個体を液肥(大 塚ハウス1号600 mg/l,大塚ハウス2号400 mg/l,大塚 ハウス5号10 mg/l;大塚アグリテクノ)入りのバット に移植し、22℃・14時間日長のインキュベーターで行い、 86日後に試験に供試した.供試する葉柄は、展開し終わ った最上位葉から第3葉までの葉柄を用いた.葉柄の調 製は、本章2-1-1(2)に従った.

(2) 葉柄へのインジェクション方法の検討

アグロバクテリウムが、切り離した葉柄ヘインジェク ション可能かどうか、模擬的に BPB 水溶液を用いて検討 した.0.2% BPB 水溶液をシリンジ(BD ロードーズ 30G: Becton, Dickinson and Company)に詰め、葉身側切り口の 葉身表面側の表層付近に針を刺した.徐々に BPB 水溶液 を注入し、反対側の切り口から液が染み出すまで注入し た.

(3) 供試アグロバクテリウムの調製

アグロバクテリウムは、GUS 遺伝子を導入した pBI-OX-GW (インプランタイノベーションズ)を形質転 換した LBA4404 菌株 (Invitrogen)を供試した.供試ア グロバクテリウムは、LB 培地 (100 µg/ml ストレプトマ イシン、50 µg/ml カナマイシン含む;別表 2)で28℃・ 180 rpm・1 晩振とう培養した後、3000 ×g・10 分間遠心 して回収した.その後、MS20 培地 (別表 2) に懸濁して OD<sub>600</sub> の値を 0.5 に調整し、28℃・20 rpm・3 時間振とう してアグロバクテリウム接種液とした.

(4) シリンジによるアグロインフィルトレーション

アグロバクテリウム接種液をシリンジ (BD ロードー ズ 30G: Becton, Dickinson and Company) に詰め,本章 2-2-1(2)に従って切り離した葉柄にインジェクションし た.

(5) バキュームによるアグロインフィルトレーション 50 mlの滅菌ディスポーザブルチューブに、30 mlのア グロバクテリウム接種液と切り離した葉柄を入れ、パラ フィルムでフタをしてメスで穴を開けた. ローターを外 した遠心エバポレーターに 50 ml チューブを入れ, 突沸 しないように注意して 20 分間バキュームした.

(6) アグロバクテリウムの感染および GUS 染色

アグロインフィルトレーションした葉柄は,滅菌純水 2 mlを加えた85 mmろ紙入り9 cmシャーレ(滅菌済み) に静置した.シャーレは25℃・14 時間日長のインキュベ ーターで3日間静置し,葉柄へのアグロバクテリウムの 感染を促した.

その後、50 mlの滅菌ディスポーザブルチューブに、 30 mlのX-Gluc溶液(別表2)とアグロバクテリウムを 感染させた葉柄を入れ、パラフィルムでフタをしてメス で穴を開けた.ローターを外した遠心エバポレーターに 50 mlチューブを入れ、突沸しないように注意して20分 間バキュームした.その後、50 mlチューブのパラフィ ルムを外してフタを閉め、37℃・暗黒下で一晩静置した. 次にX-Gluc基質液を除いた後、70%エタノールを適量 加えた.さらに、エタノール・酢酸(6:1)溶液に置換 し、随時新しい溶液に取り替えながら脱色した.脱色が 終了した後は、70%エタノールに置換した.GUS活性は、 葉柄を輪切りにし、切り口の着色を肉眼および実体顕微 鏡下で確認した.

#### 2-2-2 結果

イチゴ炭疽病耐病性に関連が示唆される遺伝子の機能 解析を行うため、アグロインフィルトレーション法適用 の可能性について検討した.まず模擬実験として、植物 体から切り離した葉柄を用い、切り口からシリンジの針 を刺して BPB 水溶液をインジェクションした.その結果、 比較的容易に反対側の切り口から BPB 溶液が染み出し、 葉柄が青く染まったことが確認できた(図 5-4).

そこで、GUS 遺伝子を導入したアグロバクテリウムを MMA 培地に懸濁し、シリンジによりインジェクション した結果、BPB 水溶液と比較してインジェクションに抵 抗感があったものの、反対側の切り口から溶液が染み出 した.しかし GUS 染色後、葉柄断面を輪切りにして確認 したところ、GUS 活性が認められたのはシリンジの針を 刺した傷跡周辺のみであった(図 5-5).

次に、バキュームによるアグロインフィルトレーショ ンを試みた. 葉柄をアグロバクテリウム懸濁液に浸し、 エバポレーターを用いて吸引した. GUS 染色を行って葉 柄断面を輪切りにして確認した結果, GUS 活性が認めら れたのは切り口付近の断面のみで、切り口から離れた断 面では GUS 活性は認められなかった(図 5-6).



図 5-4 シリンジを用いた BPB 水溶液のイチゴ葉柄へのインジェクション 写真上部の葉柄は無処理,下部の葉柄は BPB をインジェクションした葉柄. 植物体から切り 離した葉柄に,葉身側切り口からシリンジを使って 0.2 % BPB 水溶液を注入した.



図 5-5 シリンジによるイチゴ葉柄へのアグロインフィルトレーション インジェクション時に刺した針跡周辺でのみ GUS 活性が認められた.



図 5-6 バキュームによるイチゴ葉柄へのアグロインフィルトレーション a:切り口付近の断面, b:切り口から離れた部位の断面.切り口付近の断面でのみ GUS 活性が認められた.

## 3 SMYEV ベクターの構築

高村(2010)が構築した SMYEV T-1 ベクターは、マ ルチクローニングサイト(MCS: Spe I, Xho I, Nhe I サイ トを含む)に導入した遺伝子を発現させるために、CP のプロモーター配列を利用している.SMYEV は TGB3 と CP の配列が一部重なって存在するため、ベクター化 するに当たり TGB3 や CP の一部配列がどうしてもタン デムに重複してしまう.SMYEV T-1 ベクターを大腸菌内 で増殖,または MCS に遺伝子を導入したベクターを大 腸菌に形質転換したところ、MCS を含む重複配列が脱落 した(図 5-7).そこで,配列が脱落しにくい安定したベ クターを得るため,構造の異なる3種類の SMYEV-Vec1, SMYEV-Vec3, SMYEV-Vec4 のベクターを再構築した.

#### 3-1 材料および方法

## **3-1-1** 供試 SMYEV 感染性クローンおよびプラスミド の調製

SMYEV 感染性クローンは, SMYEV T-1 感染性 cDNA 全長クローンプラスミド (高村, 2010)を供試した. プラ スミドは大腸菌 DH5 $\alpha$ に形質転換し, LB 寒天培地 (100  $\mu$ g/ml アンピシリン含む; 別表 2)に塗布して 37℃で 1 晩インキュベートした後,シングルコロニーを単離した. 大腸菌の増殖は, LB 培地 (100  $\mu$ g/ml アンピシリン含む; 別表 2) で 37℃・一晩振とう培養し,遠心分離によって 回収した. プラスミドの抽出は, FosmidMAX DNA **Purification Kit (Illumina)**を用い、付属のプロトコール に従った.

#### 3-1-2 SMYEV-Vec1の構築

SMYEV-Vec1 は、高村(2010)が構築した SMYEV T-1 ベクターに準じて構築した.ただし、MCS 下流にある 「TGB3の一部」の中に終止コドンが2連で入るように2 か所に点突然変異を導入した. SMYEV 感染性クローン を鋳型 DNA とし、プライマーペア CF2 / vecNR1 および vecNF1 / CR2(別表1)でそれぞれ PCR を行い2 個の DNA 断片を作製した.プライマーvecNR1には制限酵素 Xho I (以下,制限酵素は全てタカラバイオ)および Spe I サ イトを、vecNF1には Xho I および Nhe I サイトを付加し た. そのため、2つの断片を Xho I 処理して断片同士をラ イゲーションすると, Spe I, Xho I および Nhe I の MCS を含む1つの断片が作出できる.また、プライマーvecNF1 は野生株の配列から2塩基を置換してあるため、マルチ クローニングサイト下流の「TGB3 の一部」に終止コド ンが2連で導入される、ライゲーションして得られた断 片をTAクローニングし、ベクター配列クローンを得た. プライマーCF2とCR2アニーリング部位の更に内側には、 それぞれ制限酵素 Hind III および BamH I サイトがあるた め、それらの制限酵素を用いて SMYEV 感染性クローン にベクター配列断片を導入し SMYEV-Vec1 を作出した (図 5-8).



#### 図 5-7 SMYEV T-1 ベクターの脱落する部位 [高村(2010)の図を改変]

脱落は MCS を含んだ重複配列を排除するように起こる. ORF1, TGB1, 2, 3 および CP は, それぞれ SMYEV の 翻訳領域を示す. 35S は CaMV 35S プロモーター, nosT はノパリン合成酵素ターミネーターを示す.



#### 図 5-8 SMYEV-Vec1 の概要と作製に使用した PCR プライマー

矢印はベクター配列を増幅するプライマーとその伸長方向を示した.赤く示した部分および MCS は、マルチクロー ニングサイトを示す. MCS 両側に青く示した部分は、ベクター化に伴い重複する配列を示し、CP プロモーター70bp と CP 開始コドンから 131 bp の配列を含む.「TGB3 の一部」の赤線は、導入した変異を示す.

#### 3-1-3 SMYEV-Vec3の構築

SMYEV-Vec3 は, ORF1 と TGB1 の間に TGB1 のプロ モーター部分を重複させ MCS を導入した. ベクター構 築の方法は, プライマーvecNR1 を vecNR3-2 に, vecNF1 を vecNF3-2 に変更する以外は, 本章 3-1-2 に従った. た だし, TGB1 の開始コドンが ATC であったため, MCS 前の開始コドン (プライマーvecNR3-2 に含まれる) は ATG に変更した (図 5-9).

#### 3-1-4 SMYEV-Vec4の構築

SMYEV-Vec1 は, ORF1 と TGB1 の間に CP のプロモー ター部分と MCS を導入した. SMYEV 感染性クローンを 鋳型 DNA とし, プライマーペア CF2 / vecNR4-1 および vecNF4-1 / vecNR4-2 でそれぞれ PCR を行い 2 個の DNA 断片を作製した. プライマーvecNR4-1 と vecNF4-1 には *Mlu* I サイトを付加しているため, 2 つの断片を *Mlu* I 処 理してライゲーションした後, TA クローニングにより CF2 から vecNR4-2 までのクローンを得た. その後, 得 られたクローンからプライマーCF2 と vecNR4-2 で PCR を行い, DNA 断片を作製した.また,もう一方の vecNF3-2 と CR2 に挟まれた断片は SMYEV-Vec3 と同じ配列であ るため,本章 3-1-3 で増幅した断片を流用した. それぞ れの断片を *Xho* I 処理し, 以降は本章 3-1-2 に従った(図 5-10).

#### 3-1-5 ベクター構築に用いる DNA 断片の増幅と精製

ベクター構築に用いる DNA 断片は, KOD -Plus-(TOYOBO) を PCR 酵素として用い, 付属のプロトコ ールに従って 50 µl の系で PCR 増幅した. PCR 産物は一 部を電気泳動して増幅を確認した. その結果, 目的以外 の DNA 断片が含まれていた場合は, ゲルから目的の断 片を切り出して illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare : 以降 illustra Kit) で精製 した. 目的の DNA 断片のみの場合は, 直接 illustra Kit で精製した. ただし, プライマーペア vecNF4-1 / vecNR4-2 を用いた PCR 増幅産物は, 分子量が小さく illustra Kit 精製では十分な収量が得られなかったため, フェノール・クロロホルム抽出, クロロホルム抽出及び エタノール沈殿により精製した.

#### 3-1-6 作製した DNA 断片のクローニングとシーケンス

PCR 増幅した DNA 断片は制限酵素で切断し, T4 DNA Ligase (New England Biolabs) により DNA 断片同士をラ イゲーションした. その後 A-tailing を行って pGEM-T Easy Vector (Promega) にライゲーションし,大腸菌 DH5 $\alpha$ に形質転換した. 出現したコロニーは,インサートの両 端を増幅するプライマーを用いて PCR し,電気泳動によ り増幅産物の大きさを確認した.予想された大きさの増 幅産物を Exonuclease I (New England Biolabs), Shrimp



図 5-9 SMYEV-Vec3 の概要と作製に使用した PCR プライマー

矢印はベクター配列を増幅するプライマーとその伸長方向を示した.赤く示した部分および MCS は、マル チクローニングサイトを示す. MCS 両側に青く示した部分は、ベクター化に伴い重複する配列を示し、TGB1 プロモーター55 bp の配列を含む.



#### 図 5-10 SMYEV-Vec4 の概要と作製に使用した PCR プライマー

矢印はベクター配列を増幅するプライマーとその伸長方向を示した.赤く示した部分および MCS は、マルチ クローニングサイトを示す. MCS 上流と ORF4 の青く示した部分は、ベクター化に伴い重複する配列を示し、 CP プロモーター73 bp の配列を含む. alkaline phosphatase (USB) 処理し,シーケンスを行って 塩基配列を確認した.予想された塩基配列(ベクター配 列)であった場合,そのクローンを LB 培地で増殖しプ ラスミドを抽出した.

## **3-1-7** クローニングした DNA 断片と SMYEV 感染性ク ローンの制限酵素処理

抽出したプラスミドを制限酵素 *Hind* III 及び *BamH* I で処理した後,電気泳動して SMYEV ベクター作製に必 要な DNA 断片 (ベクター配列断片)を回収し, SMYEV 感染性クローンとのライゲーションに供試した. SMYEV 感染性クローンは制限酵素 *Hind* III 及び *BamH* I で処理し, 電気泳動で確認した. その後,セルフライゲーションを 防ぐためアルカリフォスファターゼ (Calf Intestinal; New England Biolabs)処理し,ベクター配列断片とのライゲ ーションに供試した.

## 3-1-8 SMYEV感染性クローンとベクター配列断片のラ イゲーション及び形質転換

SMYEV 感染性クローンとベクター配列断片のモル比 を1:5に調整してライゲーションを行った.その後,大 腸菌 DH5aに形質転換して,LB寒天培地(100 µg/mlア ンピシリン含む;別表 2)に塗布した.出現したコロニ ーをプライマーペア CF2 / CR2 または MCS-f / MCS-r を 用いて PCR し,電気泳動で増幅産物を確認した.予想さ れたバンドが確認されたクローンの増幅産物は, Exonuclease I, Shrimp alkaline phosphatase 処理し,プライ マーCF2, Cseq-f1, Cseq-r1, Cseq-r2, MCS-r, CR2(別 表 2)を用いて,導入したベクター断片部分の塩基配列 をシーケンスし,予定通りの配列かどうか確認した.

#### 3-2 結果

#### 3-2-1 SMYEV ベクター構築に用いる DNA 断片の作製

SMYEV T-1 感染性 cDNA クローンから3種類のベクタ ーを構築するため、高正確性 DNA ポリメラーゼを用い た PCR によりベクター配列を増幅した結果、それぞれ予 想された大きさの DNA 断片が得られた. SMYEV-Vec1 を構成する断片を増幅するプライマーペア CF2/vecNR1 と vecNF1/CR2 を用いた PCR は、それぞれ 2,135bp およ び 375bp と推定されるバンドが増幅された(図 5-12 a). SMYEV-Vec3 を構成する断片を増幅するプライマーペア CF2/vecNR3-2 と vecNF3-2/CR2 を用いた PCR は、それぞ れ990 bp および 1,374 bp と推定されるバンドが増幅され た(図 5-12 b). SMYEV-Vec4 を構成する断片を増幅する プライマーペア CF2/vecNR4-1 と vecNF4-1/vecNR4-2を用 いた PCR は, それぞれ 932 bp および 97 bp と推定される バンドが増幅された(図 5-12 b). なお, SMYEV-Vec4 の 後半部分の断片は, SMYEV-Vec3 の後半部分と同一配列 であるため, Vec3 で増幅した断片を利用した. 各 DNA 断片の電気泳動結果から, SMYEV-Vec3 を構成する 2 つ の断片と SMYEV-Vec4 の CF2 / vecNR4-1 による増幅断片 は目的以外の増幅産物が認められたため, 目的のバンド のみを含むゲルを切り出して精製した.

SMYEV-Vec4 は, MCS より前の部分が 2 つの断片に分 かれているため,連結する作業を行った結果,目的の断 片である 1,017 bp と思われるバンドが得られた(図 5-12). 得られたバンドのシーケンスを行ったところ,予想した 塩基配列と同一であったため,目的とするクローンであ ると判断した.そこで,高精度 DNA ポリメラーゼを用 いてプライマーペア CF2 / vecNR4-2 を用いた PCR で DNA 断片を作製した.

次に各ベクターを構成する断片の全長を作出するため, それぞれの DNA 断片を連結し TA クローニングした. 得 られたクローンは、インサート両端のプライマーペア (CF2/CR2) を用いてコロニーPCR を行った. SMYEV-Vec1 の構築に用いる断片クローンの PCR では, 2,498 bpと推定される増幅断片が複数認められ、目的の クローンと予想されたため(図 5-14), そのうち3クロ ーンをシーケンスに供試した. その結果, 全て目的の配 列と一致したため,そのうちの1クローンを SMYEV-Vec1 のベクター配列部分のクローン (Vec1 クロ ーン)として以降の実験に供試した.同様に SMYEV-Vec3 では, 2,352 bp と推定される断片が増幅されたクローン が2個認められ、目的のクローンと予想された(図 5-15). シーケンスの結果、一方は異なる塩基配列であったが矢 印のバンドは目的とする配列であったため, SMYEV-Vec3 のベクター配列部分のクローン (Vec3 クロ ーン)として以降の実験に供試した.SMYEV-Vec4では, PCR の結果 2,378 bp と推定される断片が増幅されたクロ ーンが認められ、目的のクローンと推定された(図 5-16). シーケンスの結果,目的の配列と一致したため SMYEV-Vec4 のベクター配列部分のクローン (Vec4 クロ ーン)として以降の実験に供試した.



#### 図 5-12 SMYEV ベクター配列を増幅した PCR の結果

a:SMYEV-Vec1 のベクター配列を増幅した結果, b:SMYEV-Vec3, Vec4 のベクター配列を増幅した結果. それぞれの PCR 産物を 1.5% アガロースで電気泳動した. 矢印は目的と推定される産物を示し、数字はその断片長を示した.



#### 図 5-13 SMYEV-Vec4 のプライマーCF2 から vecNR4-2 間のクローニング結果

プライマーペア CF2 / vecNR4-1 増幅断片と vecNF4-1 / vecNR4-2 増幅断片のライゲーション産物をクローニング し,得られたコロニーの PCR 増幅結果を示した.インサート両端のプライマーペア (CF2/vecNR4-2) を用いて PCR 増幅し,1.5%アガロースで電気泳動した.矢印は目的と推定される増幅産物を示し,数字はその断片長を示した.



#### 図 5-14 SMYEV-Vec1 のベクター配列部分のクローニング結果

プライマーペア CF2 / vecNR1 増幅断片と vecNF1 / CR2 増幅断片のライゲーション産物をクローニングしコロニ ーを得た.インサート両端のプライマーペア (CF2/CR2)を用いてコロニーPCR し, 1.5%アガロースゲルで電気泳 動した.矢印は、シーケンスに供試した目的と推定される増幅産物を示し、数字はその断片長を示した.



#### 図 5-15 SMYEV-Vec3 のベクター配列部分のクローニング結果

プライマーペア CF2 / vecNR3-2 増幅断片と vecNF3-2 / CR2 増幅断片のライゲーション産物をクローニングしコ ロニーを得た.インサート両端のプライマーペア (CF2/CR2)を用いてコロニーPCR し, 1.5% アガロースゲルで 電気泳動した.矢印は、シーケンスに供試した目的と推定される増幅産物を示し、数字はその断片長を示した. 矢印が付いていない断片は、目的の断片と塩基配列が異なった.



#### 図 5-16 SMYEV-Vec4 のベクター配列部分のクローニング結果

プライマーペア CF2 / vecNR4-2 増幅断片と vecNF3-2 / CR2 増幅断片のライゲーション産物をクローニングしコロ ニーを得た.インサート両端のプライマーペア(CF2/CR2)を用いてコロニーPCRし,1.5%アガロースゲルで電気 泳動した.矢印は、シーケンスに供試した目的と推定される増幅産物を示し、数字はその断片長を示した.

#### 3-2-2 3種類の SMYEV ベクターの構築

SMYEV 感染性クローンに 3 種類のベクター配列を導入しそれぞれベクター化するため,感染性クローンと各 ベクター配列部分のクローンを Hind III および BamH I で制限酵素処理した.電気泳動により切断状況を確認す ると,SMYEV 感染性クローンおよび各ベクター配列部 分のクローンが完全に切断されていると判断された.そ れぞれの断片は,SMYEV 感染性クローンが 7,517 bp, Vecl クローンが 2,394 bp, Vec3 クローンが 2,248 bp, Vec4 クローンが 2,275 bp と予想され (図 5-17),目的の断片 と考えられた.

次に,制限酵素処理した SMYEV 感染性クローンと各 ベクター配列部分のクローン断片をライゲーションし, 大腸菌 DH5αに形質転換した.得られたコロニーは PCR によってインサート長を確認し, SMYEV-Vec1 では導入 部分を増幅する CF2 / CR2 プライマーペアで 2,498 bp, MCS を増幅する MCS-f / MCS-r プライマーペアで 481bp と推定される増幅産物が得られ (図 5-18),目的のクロ ーンと考えられた.SMYEV-Vec3 では CF2 / CR2 プライ マーペアで 2,352 bp と推定される増幅産物が得られ,目 的のクローンと考えられた.SMYEV-Vec4 では,MCS を 増幅する MCS-nf / MCS-nr プライマーペアで PCR すると 280 bp と推定される増幅産物が得られ,目的のクローン と考えられた.そのうち 3 クローンについて,CF2 / CR2 プライマーペアで PCR を行うと 2,379 bp と推定される増 幅産物が得られ,この結果からも目的のクローンと考え られた.

得られたクローンの CF2 / CR2 プライマーペアによる PCR 産物をダイレクトシーケンスした結果, SMYEV-Vec1, SMYEV-Vec3, SMYEV-Vec4 全てで目的の 配列が得られ,3種類の SMYEV ベクターが構築できた.



図 5-17 SMYEV 感染性クローンと各ベクター配列クローンの Hind III, BanH I 処理の結果 a: SMYV 感染性クローン (SMYEV-IC) および Vec1 クローンを Hind III と BanH I で処理し、1%アガロースゲ

a.SMIV 感染性クローン (SMIEV-IC) および Veci クローンを Hind III と bann I (2022), 1% アカロースケ ルで電気泳動した結果, b: 同様に Vec3 クローンの結果, c: Vec4 クローンの結果を示した. 矢印は各 SMYEV を 作製するために必要な DNA 断片で,数字はその断片長を示した.



図 5-18 SMYEV 感染性クローンへの Vec1 クローン断片導入の結果

SMYEV 感染性クローンへ Vel クローン断片を導入した. a: 導入断片全長を増幅する CF2/CR2 プライマーペア を用いて PCR を行い,得られた増幅産物を1.0%アガロースで電気泳動した.b:MCS 周辺を増幅する MCS-f/MCS-r プライマーペアを用いて PCR を行い,得られた増幅産物を1.5%アガロースで電気泳動した. 矢印は目的と推定 される増幅産物を示し,数字はその断片長を示した.



図 5-20 SMYEV 感染性クローンへの Vec4 クローン断片導入の結果

SMYEV 感染性クローンへ Ve4 クローン断片を導入した. a: MCS 周辺を増幅する MCS-nf / MCS-nr プライマー ペアを用いて PCR を行い,得られた増幅産物を 1.5 %アガロースで電気泳動した.b:目的のクローンと推定され る 3 クローンについて,導入断片全長を増幅する CF2/CR2 プライマーペアを用いて PCR を行い,得られた増幅産物を 1.0 %アガロースで電気泳動した. 矢印は目的と推定される増幅産物を示し,数字はその断片長を示した.

# 4 SMYEV ベクターへの PDS 遺伝子の導入 と大腸菌内における安定性確認

#### 4-1 SMYEV ベクターへの PDS 遺伝子の導入

#### 4-1-1 材料および方法

(1) 供試 SMYEV ベクター

本章 3-1 で構築した SMYEV-Vec1, SMYEV-Vec3, SMYEV-Vec4 の 3 種類のベクターを供試した.

(2) 供試 PDS 遺伝子およびプラスミドの調製

*PDS* 遺伝子は、栃木県農業試験場で蓄積した EST クロ ーンから *PDS* 遺伝子のアノテーションが付与されてい る StI020D03 を用いた.明らかとなっている EST 配列を 用いて NCBI の nr データベースに対して BLASTX 検索 を行うと、*F.*× *ananassa* の Phytoene desaturase protein に 対し 3E-67 の E value を示した.本クローンは、第3章 2-1-3 (1)に従って増殖、プラスミド抽出を行った.

(3) SMYEV ベクターへ導入する PDS 遺伝子配列の選 定および増幅プライマーの設計

*PDS*遺伝子の塩基配列はcDNAクローンStl020D03のEST 配列を供試し,発現抑制を引き起こしやすいと推定される 配列をsiExplorer (http://ma.chem.t.u-tokyo.ac.jp/siexplorer. htm)により選定した. *PDS*遺伝子を増幅するプライマー は,選定した配列を含み300 bp程度の産物が増幅されるよ うにPrimer 3を用いて設計した. Forwardプライマーの5'末 端側には制限酵素*Spe* Iサイトを, Reverseプライマーの5' 末端側には制限酵素*Nhe* Iサイトを付加した. なお Stl020D03のEST配列は, DNASIS pro(日立ソフトウェア エンジニアリング)を用いてORFを推定した.

(4) PCR による PDS 遺伝子断片の増幅と制限酵素処理
 および SMYEV ベクターの準備

PCR による PDS 遺伝子断片の増幅および電気泳動は, 反応液量を 20 µl にし, それ以外は本章 3-1-2 (2) に従っ た. プライマーは,本章 4-1-1 (3) で設計した stPDS10-f2 / stPDS10-r と stPDS12-f / stPDS12-r2 プライマーペアを用 いた (別表 1). 目的のバンドの増幅が確認された PDS 増幅断片は, illustra Kit で精製した後,制限酵素 Spe I と Nhe I で処理した. その後,再び illustra Kit で精製し stPDS10-f2 / stPDS10-r で増幅した断片を StPDS10, stPDS12-f / stPDS12-r2 で増幅した断片を StPDS12 とした. また,各 SMYEV ベクターは, Spe I と Nhe I で処理して 線状化し illustraKit を用いて精製した後, Alkaline Phosphatase 処理で脱リン酸化した.

(5) SMYEV ベクターへの PDS 遺伝子断片のライゲー ションおよび形質転換

制限酵素処理した PDS 遺伝子断片は, T4 DNA Ligase (New England Biolabs) により各 SMYEV ベクターにラ イゲーションし、大腸菌 DH5 α に形質転換した. *PDS* 遺 伝子断片と各 SMYEV ベクターのモル比は、10:1 とし た.

(6) SMYEV ベクターへ導入された PDS 遺伝子の確認

各形質転換で出現したコロニーは、プライマーペア MCS-f / MCS-r (SMYEV-Vec1) または MCS-nf / MCS-nr (SMYEV-Vec3, 4) (別表 1) を用い、PCR および電気 泳動して PDS 遺伝子の導入を確認した. PDS 遺伝子が導 入されていると推定されたクローンは、プライマー MCS-f と MCS-r(SMYEV-Vec1)または MCS-nf と MCS-nr (SMYEV-Vec3, 4) を用い、PCR 産物をシーケンスして 塩基配列を確認した.シーケンスは本章 3-1-4 (5) に従 った.

#### 4-1-2 結果

イチゴ cDNA クローン Stl020D03 の EST 配列を供試し, siExplorer によって SMYEV ベクターに導入する配列を 選定した結果,最も高い Score を示した配列は 3'-UTR に 位置し,2番目は CDS であった(表 5-1).そこで,それ らの配列を含む 303 bp の断片を増幅するプライマーペア stPDS10-f2/stPDS10-r および stPDS12-f/stPDS12-r2 を作 製した(別表 1). Stl020D03 のプラスミド DNA を鋳型と し作製したプライマーを用い,3'-UTR と CDS それぞれ

表 5-1	イチゴ PDS 遺伝子の発現抑制標的配列
12 J-1	

から PCR 増幅した結果, 321 bp と予想される増幅断片が 得られた (図 5-21). 3'-UTR から増幅した断片を StPDS10, CDS から増幅した断片を StPDS12 とし, それぞれを制限 酵素 Spe I および Nhe I で処理した.

3 種類の SMYEV ベクターは、制限酵素 Spe I および Nhe I で処理し電気泳動で確認したところ, SMYEV-Vec1 は9911 bp, Vec3 は 9765 bp, Vec4 は 9792 bp と推定され る断片がそれぞれ1本ずつ認められ、完全に消化された (図 5-22). そこで, StPDS10 および StPDS12 をそれぞ れライゲーションして大腸菌に形質転換した.得られた コロニーは MCS を増幅するプライマーで PCR すると、 SMYEV-Vec1 では StPDS10 または StPDS12 が導入され ていると予想されるそれぞれ推定778 bpの断片が得られ た(図 5-23). 同様に SMYEV-Vec3 では 550 bp の(図 5-24), SMYEV-Vec4 では 577 bp の増幅断片が得られた (図 5-25).得られた増幅断片はダイレクトシーケンス したところ、それぞれ目的とする配列が確認された.た だし、SMYEV-Vec3 に StPDS10 を導入したクローンは断 片が逆向きに挿入されていたため,他のクローンをシー ケンスし、目的の方向に挿入されているクローンを選ん だ. 得られた目的のクローンは, それぞれ Vec1-PDS10, Vec1-PDS12, Vec3-PDS10, Vec3-PDS12, Vec4-PDS10, Vec4-PDS12 とした.

衣 5.	$-1 \neq 7 \Rightarrow PDS$	<b>退伍丁</b> 仍飛奶和前惊的配列			
No.	5' end Position	Target sequence	Score	GC含量(%)	領域
1	118	GTGGCTAATTGTTGGAAAA	93.60	36.8	3'-UTR
2	447	CCTTGGTGTTTTAACAACA	86.03	36.8	CDS
	ちの進行するマン				2 m

PDS 遺伝子のアノテーションが付いたイチゴ cDNA クローン Stl020D03 の 3'末端からの EST 配列を用い, siExplorer によって標的配列を選抜した.



図 5-21 PCR 増幅したイチゴ PDS 遺伝子断片の電気 泳動結果

イチゴ *PDS* 遺伝子の 3'-UTR を PCR 増幅した断片 StPDS10 および, CDS を PCR 増幅した StPDS12 を 1.5 % アガロースで電気泳動した結果を示した.



図 5-22 SMYEV ベクターの制限酵素処理の結果

各 SMYEV を制限酵素 Spe I と Nhe I で処理し、1%アガロース で電気泳動して切断状況を確認した. a: SMYEV-Vec1 と SMYEV-Vec3 の結果, b: SMYEV-Vec4 の結果を示した. 数字は 推定される断片長を示した.



図 5-23 イチゴ PDS 遺伝子断片を SMYEV-Vec1 に導入した結果

イチゴ PDS 遺伝子断片を導入した SMYEV-Vec1 を形質転換して得られた大腸菌コロニーを, MCS を増幅するプライマーペア MCS-f/MCS-r を用いて PCR 増幅し,得られた増幅産物を 1.5%アガロースで電気泳動した結果を示した. 左側は 3'-UTR の StPDS10を導入したクローン,右側は CDS の StPDS12を導入したクローンの PCR 産物を泳動した. 矢印は選抜したクローン,数字は目的配列の断片長を示した.



図 5-24 イチゴ PDS 遺伝子断片を SMYEV-Vec3 に導入した結果

イチゴ PDS 遺伝子断片を導入した SMYEV-Vec3 を形質転換して得られた大腸菌コロニーを, MCS を増 幅するプライマーペア MCS-nf / MCS-nr を用いて PCR 増幅し,得られた増幅産物を 1.5%アガロースで電 気泳動した結果を示した. 左側は 3'-UTR の StPDS10を導入したクローン,右側は CDS の StPDS12を導入 したクローンの PCR 産物を泳動した. 矢印は選抜したクローン,数字は目的配列の断片長を示した.





# 4-2 ウイルスベクターと導入した PDS 遺伝子の大腸

## 菌内における安定性確認

# 4-2-1 材料及び方法

(1) 供試ベクターと大腸菌

本章 3-1 で構築した SMYEV-Vec1, SMYEV-Vec3, SMYEV-Vec4 の 3 種類のベクターおよび,本章 4-1 で作 製したイチゴ *PDS* 遺伝子の CDS 断片 StPDS12 を導入した 3 種類のベクター Vec1-PDS12, Vec3-PDS12, Vec4-PDS12 が導入された大腸菌 DH5αを供試した.なお,対照として SMYEV-T1 感染性クローンを供試した.

(2) 大腸菌の継代培養方法および安定性の確認方法

各 SMYEV ベクターおよび PDS 遺伝子を導入した SMYEV ベクターは、大腸菌内での安定性を確認するた め液体培地による継代培養を行った.大腸菌の培養は、 細菌培養用の 14 ml ディスポーザブルチューブに 1 ml の LB 培地 (100 µg/ml アンピシリン含む;別表 2)を入れ、 マスタープレートから爪楊枝で植菌して 37℃・24 時間振 とうした.継代は培養開始 24 時間後にマイクロピペット で培養液 1 µl を採取し、新しい LB 培地 1 ml に移植する ことを 4 回繰り返した.各ベクターの安定性は、各段階 での 24 時間培養した菌液 0.5µl を供試し、PCR 増幅して 予想された増幅産物が得られるかどうか確認した.プラ イマーは、SMYEV-Vec1 では MCS-f と MCS-r、 SMYEV-Vec3、Vec4 では MCS-nf と MCS-nr (別表 1)を 用いた.実験は 2 回繰り返した.

#### 4-2-2 結果

各ベクターの大腸菌内での安定性について,液体培地 で振とう培養して24時間ごとに継代し,得られた大腸菌 液を PCR することで MCS を含む領域が脱落しているか どうか確認した. SMYEV-Vec1 は481 bp, PDS 遺伝子を 導入した Vec1-PDS12 は778 bpの目的と推定される DNA 断片が,培養開始1~5日後の全ての菌液から増幅された. 同時に,感染性クローンと同じ大きさの262 bpと推測さ れるバンドの増幅も若干認められた. 同様に, SMYEV-Vec3 は235 bp, SMYEV-Vec4 は280 bp, PDS 遺 伝子を導入した Vec3-PDS12 は550 bp, Vec4-PDS12 は577 bpの目的と推定される増幅断片が,培養開始1~5日後 の全ての菌液から増幅された(図 5-26). さらに,反復 実験でも同様の結果であった.



#### 図 5-26 SMYEV ベクターの大腸菌内での安定性確認

各 SMYEV ベクターと PDS 遺伝子断片を導入した SMYEV ベクターの大腸菌内での安定性を確認した.a:培養開始1日後(継代なし)の各ベクターが導入された大腸菌を,MCSを挟むプライマーペア用いて PCR 増幅し,得られた増幅産物を1.5%アガロースで電気泳動した.b:培養開始5日後(継代4回)の各ベクターをaと同様に確認した. 各レーンは供試したクローン名とプライマーペア名を示した.SMYEV-IC は SMYEV 感染性クローンを示す.

## 5 考察

# 5-1 イチゴ葉柄を用いたアグロインフィルトレーション の試み

イチゴは遺伝的に固定されていないため、自殖後代に おいても表現形質が分離する.また、8倍体であること から2倍体と比較して相同遺伝子の数も多く,複雑なゲ ノム構成であることが予想される.そのため変異体の作 出は難しく,さらに元の系統と同じバックグランドで変 異をホモ化することはほぼ不可能と考えられる.そのた め、イチゴの遺伝子研究を行うためには、効率的な機能 解析法を確立することが非常に重要となる.そこで、各 相同遺伝子の相同領域をターゲット配列とし、全相同遺 伝子をノックダウンできる RNAi は有効なツールと考え られる.

アグロインフィルトレーションを遺伝子解析に利用し た報告は、PVX ベクターを導入したアグロバクテリウム をタバコの葉にインジェクションした例が以前から見受 けられる (Van der Hoorn et al., 2000; Tampakaki and Panopoulos, 2000; Huitema et al., 2005; Li et al., 2008; Bruce et al., 2011). タバコの葉はインフィルトレーションを行 いやすいため, TMV ベクター (Lindbo et al., 2007; Huang and Schwab, 2011) ToMV  $\checkmark \not 2 \not > \neg ($ Kubota *et al.*, 2003), RSV ベクター(Xiong et al.,2008)を用いた報告もある. また、6 種類の果実におけるアグロインフィルトレーシ ョンで GUS 遺伝子を発現させた例 (Spolaore et al., 2001) や、トマト果実で過剰発現と VIGS による発現抑制を行 った例 (Orzaez et al., 2006), イチゴ果実で RNAi ベクタ ーによる発現抑制を行った例 (Hoffmann et al., 2006; Griesser et al., 2008a) 等, 果実での報告もある. これら の例から、インジェクションすると周辺に浸潤しやすい 軟らかい組織であれば、アグロインフィルトレーション は成功しやすいと考えられる.

炭疽病耐病性品種の'農2号'も感受性品種の'とち おとめ'も葉身は斑点型病斑を形成して両品種とも抵抗 性反応を示すこと, またイチゴの葉身にインジェクショ ンは困難であることから、イチゴの葉はアグロインフィ ルトレーションに適さないと判断した.一方,植物体か ら切り離した葉柄は、炭疽病接種試験によって耐病性と 感受性を明確に判別できる(図 5-3). さらにアグロイン フィルトレーションを模して, 針付きのシリンジで BPB 水溶液を葉柄表層に注入したところ、容易に注入が可能 で注入した側の表層全体が青く染まったため、インジェ クション可能と判断した(図 5-4).しかし, GUS 遺伝子 を導入したアグロバクテリウムの懸濁液をインジェクシ ョンすると、注入に抵抗感があり反対側の切り口に液が 染み出すまでに時間を要した.また GUS 染色を行った後, 葉柄を輪切りにして染色された部位を確認したところ, 活性が認められたのはシリンジの針を刺した傷跡周辺の みであった (図 5-5). インジェクション時の抵抗感は, 葉柄組織にアグロバクテリウムが目詰まりした状態であ ったためで、反対側の切り口には水のみが染み出したと 推測される. そこで、アグロバクテリウム懸濁液に葉柄 を浸しバキュームしたが,切り口近辺は GUS 活性が認め られるものの,切り口から離れると GUS 活性は認められ なかった (図 5-6). 以上の結果から、イチゴ葉柄を用い たアグロインフィルトレーションは困難と判断した.

## 5-2 構造の異なる3種類の SMYEV ベクターの構築

高村(2010)が構築した SMYEV T-1 ベクターを用い た発現抑制による遺伝子発現解析法について検討した. まず、イチゴ PDS 遺伝子の断片を SMYEV ベクターに導 入し、大腸菌に形質転換して増殖したところ、MCS を含 む重複配列が抜け落ちた(図 5-7). また, SMYEV ベク ターを導入した大腸菌を増殖したところ、同様に MCS を含む重複配列が脱落した. SMYEV T-1 ベクターは、 MCS に導入した遺伝子を発現させるために CP のプロモ ーターを利用するため,200 bp 強の配列が重複している. これは TGB3 と CP の配列が重複しているためで, TGB3 の ORF 全長を確保するために必要である. 結果として MCS の前に CP の一部配列が挿入され、導入遺伝子との 融合タンパク質が発現する構造となり, MCSの下流には 不完全な TGB3 タンパク質が発現する構造の可能性があ る. SMYEV T-1 ベクターはほぼ同じ部分の脱落が再現さ れ、構造上に問題があると考えられたため、新たに3種 類の異なる構造のベクターSMYEV-Vec1, Vec3, Vec4 を 再構築した.

SMYEV-Vec1 は, SMYEV T-1 で発現する可能性のある MCS 下流の不完全な TGB3 に,終止コドンが 2 連で入る ように変異を導入した(図 5-8). SMYEV-Vec3 は、SMYEV の ORF 間で唯一配列が重複していない ORF1 と TGB1 の間に、TGB1のプロモーター部分を重複させて MCS を 導入した(図 5-9). SMYEV-Vec4 は, ORF1 と TGB1 の 間に、CP のプロモーター部分と MCS を導入した(図 5-10). 各ベクターと各ベクターにイチゴ PDS 遺伝子組 み込んだプラスミドを大腸菌に形質転換し、24時間ごと に継代して5日間培養した. 増殖した大腸菌を鋳型とし て MCS を挟むプライマーで PCR すると、全てのベクタ 一の全てのサンプルで目的の増幅産物が確認され、各べ クターの大腸菌内での安定性は SMYEV T-1 より向上し たと推察された.しかし SMYEV-Vec1 は、感染性クロー ンと同じ位置にも若干の増幅が認められたため、一部に 脱落が起こっている可能性が示唆される.ただし、培養 開始1日後と5日後の電気泳動像を比較すると,脱落し たベクターの割合は変化していないと見られ、実用上間 題はないと考えられる. 一方 SMYEV-Vec3 と Vec4 は, 感染性クローンと同じ位置にバンドが認められなかった ため、SMYEV-Vec1 より大腸菌内での安定性は高いと考 えられた. SMYEV は TGB3 と CP が重複しているが (Jelkmann et al., 1992; Lamprecht and Jelkmann, 1997; 高 村, 2010), 他の Potexvirus 属に属する PVX や CymMV は重複していない (Huisman et al., 1988; Wong et al., 1997). この重複が, SMYEV T-1 ベクターおける一部配列脱落の

ー因であることは十分に考えられる.また, SMYEV-Vec1 では MCS に導入した遺伝子の5'末端側に CP 配列の一部 が付加されるため、導入した遺伝子は融合タンパク質と して発現することになる.さらに、SMYEV-Vec3 と Vec4 は MCS を ORF1 と TGB1 の間に導入したため、PVX ベ クターや CymMV ベクターと MCS の位置が異なり (Chapman *et al.*, 1992; Lu *et al.*, 2007),発現抑制ベクタ ーとして機能するかなど今後の課題は多い. 本研究では,SMYEV ベクターの VIGS 効果の検証ま では至らなかったが,今後3つの異なる構造のベクター のイチゴ植物体内での安定性や PDS 遺伝子の発現抑制 効果を検証し,最も優れたベクターを明らかにしたい. これらのベクターを用いた機能解析法が確立できれば, 炭疽病耐病性関連遺伝子だけではなく,他の遺伝子につ いても効率的な機能解析が可能となり,イチゴ有用遺伝 子の単離・同定の大幅な加速化が期待できる.

## 第6章 総合考察

イチゴの全国における産出額は米、トマト、ネギ、ミ カンに次ぎ、1.501 億円(平成 22 年農林水産統計)で全 国的にも重要な品目となっている.現在の日本における イチゴ栽培は、遺伝的に未固定な品種を用い、原苗から 数年かけてランナー増殖した苗を商業栽培に用いる形態 が主流である、そのため、他の野菜と比べて民間企業が 参入しにくく、公的機関が種苗生産に関わっている場合 が多い. さらにランナー増殖による種苗生産は、1 度の 交配でそのまま品種となる可能性があることを意味する. そのため、多くの県で品種育成が行われ、近年多くの新 品種が登録されている.一方、栃木県におけるイチゴは 県農産物のシンボルと位置づけられ、最も育種に力を注 いでいる品目であり、平成 23 年には '栃木 i27 号' を品 種登録出願している.しかし、イチゴは多くの品種が作 出されているにも関わらず,8倍体で遺伝的に固定して いないことから遺伝学的な解析は難しく、これまでの品 種改良は育種家の勘に頼ってきた経緯がある.

2009年における世界のイチゴ生産は、アメリカ合衆国 が127万トン、24.1億\$と生産量、生産額ともに1位であ るのに対し、日本は18.5万トンの生産量で8位、16.3億 \$の生産額で2位である(FAOSTAT).このデータは、日 本におけるイチゴの単価が極めて高いことを示している. イチゴの消費方法や消費者心理、物価等、様々な要因が 異なるため単純には比較できないが、日本品種の持つ品 質の高さが反映されていると考えられる.海外ではGDR を中心として、2倍体野生種による連鎖地図の作成やゲ ノムシーケンス、ESTの蓄積等の基盤研究が進み、公開 された情報からはゲノム研究の進展が窺われる.日本に おいても、現在の優れた品種群を利用したゲノム研究等 の基盤的な研究を行う枠組みが必要と考えられる.

本研究では、イチゴにおける重要病害である炭疽病の 耐病性について、耐病性品種である'農2号'の培養植 物が本来の耐病性を発現せず、順化することによって耐 病性が向上することに着目し、遺伝子発現レベルで解明 することを目指した.それによって、イチゴの炭疽病耐 病性育種を効率化するための技術開発だけでなく、炭疽 病防除技術への応用が期待される.また本研究では、イ チゴ cDNA マイクロアレイによる大量遺伝子発現解析や、 効率的な遺伝子機能解析が可能となるウイルスベクター の構築などに取り組んだ.これらの技術は、イチゴにお ける DNA 研究に貢献するとともに、順化によって耐病 性が向上するという現象を利用した解析は、他の耐病性 研究にも応用できるかもしれない.

### 1 イチゴにおける防御応答

本研究は、イチゴ炭疽病菌を接種した炭疽病耐病性品 種 '農2号'の葉身の斑点型病斑が、感受性品種 'とち おとめ'に比較して早く形成されることに端を発する. 斑点型病斑の形成状況を詳細に解析し、表現型から 'と ちおとめ'に比べ'農2号'の防御応答の早さが示唆さ れ、炭疽病耐病性の重要な要因の1つと推察された。さ らに、この現象を遺伝子発現レベルで捉えるため、'農2 号'と'とちおとめ'に炭疽病菌を接種し、防御応答遺 伝子発現の品種間差異を検出しようとした.まず,栃木 農試で蓄積したイチゴ EST の中から,防御応答遺伝子と 推定されるクローンを選抜し,防御応答のシグナル物質 である SA. JA. ACC を処理してそれらの遺伝子の発現 を解析した. その結果から, SA 応答経路のマーカー遺 伝子として Thaumatin-like protein 遺伝子, JA 応答経路の マーカー遺伝子として Lipoxygenase 遺伝子と推定される 遺伝子を選抜し、炭疽病菌に対する防御応答経路の推定 を行った.炭疽病菌接種による Lipoxygenase 遺伝子の有 意な発現上昇は認められず、JA応答経路の関与する可能 性は低いと推察された. また, 炭疽病菌接種によって Thaumatin-like protein 遺伝子の発現が上昇傾向を示した ため、炭疽病に対する応答に SA 経路の関与が示唆され るが、小幅な上昇であるため他に主要な防御応答のメカ ニズムがある可能性も考えられた. そのため,防御応答 遺伝子の発現パターンから '農2号'の防御応答の早さ を遺伝子発現レベルで明らかにするという試みは達成で きなかった.

しかし,接種条件を検討している中で,耐病性に関わるもう1つの重要な要因を見い出した.イチゴ炭疽病は 潜在感染する場合があり(橋田ら,1988;石川ら,1989a; 手塚・牧野,1989),潜在感染株を遺伝子発現解析に供試 した場合,正確な解析ができないと思われる.また当然 のことながら,サンプル植物の個体間差や環境要因はで きるだけ排除したい.そこで,環境条件がより一定で無 菌状態である培養個体を用いて接種試験を行ったところ, 通常枯死しない'農2号'が全て枯死した.この結果は,

・農2号、の無菌培養個体は本来の炭疽病耐病性を発現していないことを示す.さらに、培養個体を順化して炭 疽病菌を接種すると、、、農2号、は順化期間が3日,9日, 15日と長くなるにつれて耐病性も向上した.無菌培養個 体の炭疽病耐病性は、厳密に言えば、とちおとめ、より 、農2号、が若干強いが、両品種とも接種後4週間以内 に全個体枯死することから弱いといえる.そして、両品 種とも同じ条件で順化をするにもかかわらず、、、農2号、 は徐々に耐病性が向上するのに対し、とちおとめ、は変 わらない(図 2-6,図 2-7).そこで、'農2号'と'とち おとめ'をそれぞれ順化することで発現が変動する遺伝 子発現を明らかにし、その中で'農2号'のみが特異的 に変動する遺伝子を選抜すれば、その中に高い確率で'農 2号'の耐病性向上に関係する遺伝子が含まれていると 考えた.

本実験系では、培養植物は滅菌した培養土を培地とし て用いており、順化は培養ビンのフタを開けるのみであ る.無菌培養個体の順化という大きな環境変化を、比較 的小さな影響に止められたことが再現性の良い結果につ ながったと考えられる.今回は炭疽病耐病性と順化の関 連性について検討したが、例えばもう1つのイチゴの重 要病害である萎黄病耐病性と順化の関係はどうなのか、 また萎黄病耐病性でも耐病性遺伝資源は複数存在すると 推定されるため(Mori et al., 2005)遺伝資源によって異 なるのか、他の植物ではどうなのかと興味は尽きない. 順化を利用した耐病性解析法の汎用性については、今後 の検討課題である.

# 2 順化を利用した '農 2 号' 炭疽病耐病性関連遺伝 子の解析

順化することによる大きな環境の変化としては、培養 ビンのフタを開放することによる湿度の低下と、空気中 の微生物や潅水に用いた水道水中に含まれる微生物との 接触の2点が考えられる. 無菌培養中の常に高湿度の状 況下からインキュベーター中でのフタの解放による湿度 低下は、乾燥ストレスを起こすことが予想される. 乾燥 ストレスは ABA 応答経路を誘導し、ABA を介した環境 ストレス応答は SA 応答と拮抗的に働く(Umezawa et al., 2010; Yasuda et al., 2008). 本研究でも Thaumatin-like protein と推定される2クローンの発現パターンから、順 化による耐病性向上に SA 応答経路が関与する可能性は 低いと考えられる. また湿度の低下は, 耐乾燥性を向上 させる植物体表面の変化も引き起こすことが予想される. シロイヌナズナでは、乾燥ストレスで発現が活性化され る MYB 転写因子が、クチクラワックスの生合成を活性 化することで乾燥耐性に貢献しており、またクチクラが Botrytis cinerea の抵抗性を担っていることが明らかとな っている (Seo et al., 2011; Bessire et al., 2007). 順化に よる '農2号'の耐病性向上にも、 クチクラワックスが 関わっているかもしれない. さらに、無菌培養個体の順 化は微生物との接触をもたらし、非宿主抵抗性の誘導を 始めとして様々な変化が植物体に起こると考えられる. そのため、順化によって多数の遺伝子が変動することを 予測した.しかし予想に反し、cDNA マイクロアレイ解

析に供試した 8,380 クローンのうち, '農2号'の順化で 発現が 2 倍以上に上昇したクローンは 212 個(全体の 2.5%), 1/2 以下に低下したクローンは 134 個(同1.6%) と少なかった. これは, 今回採用した順化方法が環境変 化を最小限に抑えているためと推測され, 順化による耐 病性向上に関連する遺伝子の検索には適していると考え られた.

次にアレイ解析で選抜した遺伝子について、リアルタ イム RT-PCR 解析によって詳細に遺伝子の発現解析を行 った.炭疽病耐病性の'農2号'と感受性の'とちおと め'の、それぞれ無菌培養個体と順化個体の遺伝子発現 を比較し、'農2号'順化個体の発現量のみが有意に高い 遺伝子を検索した、その結果、得られた5クローン中4 クローンがフラボノイド生合成に関与すると推定された (表 4-7). そこで、アレイ解析結果で選抜されなかった フラボノイド生合成遺伝子について、アレイ解析データ を再検証することを考えた. すると cDNA マイクロアレ イには、フェニルアラニンからアントシアニンまでとそ こから派生するフラボノイド生合成を触媒する 13 酵素 23 非重複クローンがスポットされていた. これら遺伝子 の発現は順化することによって概ね上昇し、'とちおとめ' に比べ'農2号'でより高く上昇する傾向が認められた. これらの遺伝子についても、リアルタイム RT-PCR によ る詳細な発現解析を行う必要がある. さらに, 第5章で 構築した SMYEV ベクターを用いた発現抑制による機能 解析法を早急に確立し、'農2号'の耐病性とフラボノイ ド生合成経路との関連性の解明が望まれる.また、'農2 号'の防御応答の早さとフラボノイド生合成経路の関連 性にも興味が持たれる.

順化による '農2号' 耐病性の向上は, 順化期間が3, 9,15日と長くなるに従って徐々に向上することから、 第2章でSARやISRとは異なった機構であると考察した. アレイ解析の結果よりフラボノイド生合成経路が活性化 することが示唆されたため,ファイトアレキシンとの関 連性に興味が持たれる. ソルガムでは、フラボノイド系 ファイトアレキシンの合成が MYB 転写因子によって制 御される耐病性が明らかとなっている (Ibraheem et al., 2010). これは、1 遺伝子支配のため'農2号'の炭疽病 耐病性とは異なるが, 複数の遺伝子が関与する複雑なメ カニズムの中の1つとして、十分に考慮に値する.また、 ・農2号、順化時のフラボノイド生合成経路の活性化が、 通常のイチゴ栽培条件下の温室個体においても持続して いることが示唆された. これは'農2号'のフラボノイ ド生合成経路が、 'とちおとめ' と比べて常に活性化され ている可能性を示唆しており、耐病性との関連を支持す

る結果であると思われる. さらに, これらの遺伝子が常 に高い発現を示していることから, ファイトアンティシ ピンの関与も考えられる. 本研究を更に進めれば, 順化 による'農2号'の耐病性向上のメカニズムが明らかに なり, '農2号'耐病性メカニズムの全体像がおぼろげな がら見えてくるかもしれない.

# 3 遺伝子発現抑制を用いたイチゴ遺伝子機能解析 法

栃木農試でイチゴ2倍体野生種を用いた形質転換法を 確立していることは,既に第5章で述べた.しかし,フ ラボノイド生合成経路と耐病性の関連性を詳細に検討す るためには,形質転換系による機能解析では効率が悪い. そこで当時,高村(2010)が開発中であった SMYEV ベ クターの利用を考えた.しかし,さらに効率の良い方法 がないか検討していたところ,イチゴの果実において RNAi ベクターを用いたアグロインフィルトレーション により,CHS 遺伝子のサイレンシングを行っている例が 見られた(Hoffmann et al., 2006).そこで,本研究では葉 柄を用いたアグロインフィルトレーションによる遺伝子 機能解析法の確立を目指した.その結果,葉柄による炭 疽病耐病性検定法は確立できたが,残念ながら葉柄にお けるアグロインフィルトレーションは失敗に終わった.

しかし、本法は炭疽病耐病性について特化した遺伝子機 能解析法を想定していたため、効率は劣るものの汎用性 に優れると考えられる SMYEV ベクターによる発現抑制 法が確立できれば問題は無い.高村(2010)が開発した SMYEV ベクターは大腸菌内での安定性に欠けていたた め、MCS の場所や導入遺伝子を制御するプロモーターを 変更した新たな3種類のベクターを構築した.それらの ベクターは、大腸菌内での安定性は全て向上していると 考えられる.

栃木農試では cDNA マイクロアレイを用い,これまで

に'農2号'と'とちおとめ'を供試した炭疽病菌接種 後の遺伝子発現解析や,'とちおとめ'の果実成熟に伴う 遺伝子発現解析を行ってきた.また現在は,萎黄病耐病 性に関する解析を行っている.SMYEV ベクターによる 遺伝子発現抑制法が開発できれば,それらのアレイ解析 から選抜された遺伝子群の機能解析が可能となる.また 将来的には,これまでに作製した有用遺伝子の連鎖マー カーや今後開発するであろうマーカーを用い,マップベ ースクローニングに取り組むことが予想される.その時, SMYEV ベクターが強力な解析ツールとなることは間違 いない.

#### 4 結語

本研究では'農2号'の炭疽病耐病性について,表現 型上の2つの要因を明らかにし,遺伝子発現レベルでの メカニズムについて解析を行った.その結果,いくつか の知見が得られ,耐病性メカニズムの一端を垣間見るこ とができたが,全体像の解明にはほど遠い.しかし,メ カニズムを解明するための糸口が見えてきたことで,研 究の進展が加速すると考えられる.

一方,メカニズム解明に不可欠である効率的な遺伝子 機能解析法については,大腸菌内で安定して増殖できる 3 種類の SMYEV ベクターを構築できた. SMYEV ベク ターを用いた遺伝子発現抑制による機能解析法は,炭疽 病耐病性関連遺伝子だけでなく,他のイチゴ遺伝子の単 離・同定を大幅に加速させ,遺伝子研究を推進する原動 力になると考える.今後,イチゴ植物体への感染性,組 織内での安定性,遺伝子発現抑制の効果を検討し,総合 的にどのベクターが良いか判断したい.その後,組織ご との適用性を明らかにし,発現ベクターとしての可能性 についても検討したい. SMYEV ベクターの利用範囲を 拡大することで,イチゴ遺伝子研究へのより大きな貢献 が期待できる.

## 謝辞

本研究の遂行にあたり,終始丁寧な御指導,御鞭撻を 賜りました宇都宮大学農学部夏秋知英教授に深甚なる感 謝の意を表しますとともに,厚く御礼申し上げます.ま た,終始御指導,御督励を賜りました宇都宮大学農学部 奥田誠一名誉教授,西川尚志准教授に深く感謝申し上げ ます.

本論文の御校閲を賜りました東京農工大学農学部寺岡 徹教授,有江力教授,茨城大学農学部阿久津克己教授, 宇都宮大学農学部村井保教授に心より御礼申し上げます.

本研究を進めるにあたり,終始御討論,御助言いただ いた栃木県農業試験場天谷正行博士(現栃木県農政部経 営技術課)に心から感謝の意を表します.また,イチゴ 炭疽病に関して御指導,御助言いただいた栃木県農業試 験場石川成寿博士,中山喜一氏に深く感謝いたします. さらに,バイオインフォマティクスに関して御指導,御 助言いただいた明治大学農学部矢野健太郎準教授に御礼 申し上げます. cDNA マイクロアレイ作製にご尽力された栃木県農業 試験場松島雄大氏(現栃木県下都賀農業振興事務所),森 島正二氏(現農業環境指導センター),SMYEV ベクター 作製にご尽力された宇都宮大学大学院農学研究科高村佳 明氏(現株式会社日本葉緑素)に感謝申し上げます.ま た,イチゴ炭疽病菌を分譲いただいた栃木県農業試験場 福田充氏(現農業環境指導センター)に感謝いたします.

宇都宮大学農学部王蔚芹博士,東京農工大学大学院連 合農業研究科大川篤史博士(現梅乃宿酒造株式会社)に は,実験に関する御助言,御協力をいただきました.こ こに感謝の意を表します.

本研究の実験材料養成と実験補助にご協力いただきま した栃木県農業試験場田村茂子氏には、心より感謝いた します.

最後に、本研究の遂行にあたり、終始暖かい励ましを いただき、様々な形で御支援、御協力いただきました栃 木県農業試験場生物工学研究室の皆様をはじめ、励まし、 御支援いただいた栃木県農業試験場ならびに県庁職員の 皆様に、厚く御礼申し上げます.

## 引用文献

- Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. Nature 408:796-815.
- Aharoni A., Keizer L.C., Bouwmeester H.J., Sun Z., Alvarez-Huerta M., Verhoeven H.A., Blaas J., van Houwelingen A.M., De Vos R.C., van der Voet H., Jansen R.C., Guis M., Mol J., Davis R.W., Schena M., van Tunen A.J. and O'Connell A.P. (2000) Identification of the *SAAT* gene involved in strawberry flavor biogenesis by use of DNA microarrays. Plant Cell 12:647-662.
- Aharoni A. and O'Connell A.P. (2002) Gene expression analysis of strawberry achene and receptacle maturation using DNA microarrays. J Exp Bot 53:2073-2087.
- Aharoni A., Keizer L.C., Van Den Broeck H.C., Blanco-Portales R., Muñoz-Blanco J., Bois G., Smit P., De Vos R.C. and O'Connell A.P. (2002) Novel insight into vascular, stress, and auxin-dependent and -independent gene expression programs in strawberry, a non-climacteric fruit. Plant Physiol 129:1019-1031.
- Aharoni A., Giri A.P., Verstappen F.W., Bertea C.M., Sevenier R., Sun Z., Jongsma M.A., Schwab W. and Bouwmeester H.J. (2004) Gain and loss of fruit flavor compounds produced by wild and cultivated strawberry species. Plant Cell 16:3110-3131.
- Aida Y., Tamogami S., Kodama O. and Tsukiboshi T. (1996)Synthesis of 7-methoxyapigeninidin and its fungicidal activity against *Gloeocercospora sorghi*. Biosci Biotechnol Biochem 60:1495-1496.
- 赤木博・大和田常晴・川里宏・野尻光一・安川俊 彦・長修・加藤昭 (1985) イチゴ新品種「女峰」 について. 栃木農試研報 31:29-41.
- 秋山征夫・山元義久・近江戸伸子・大島正弘・福 井希一 (2000) フローサイトメトリーを用い たイチゴゲノムサイズの解析. 育種学研究 2 (別 2):30.
- Alonso J.M., Hirayama T., Roman G., Nourizadeh S. and Ecker J.R. (1999) EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in Arabidopsis. Science 284:2148-2152.

- Berardini T.Z., Mundodi S., Reiser L., Huala E., Garcia-Hernandez M., Zhang P., Mueller L.A., Yoon J., Doyle A., Lander G., Moseyko N., Yoo D., Xu I., Zoeckler B., Montoya M., Miller N., Weems D. and Rhee S.Y. (2004) Functional annotation of the Arabidopsis genome using controlled vocabularies. Plant Physiol 135:745-755.
- Bessire M., Chassot C., Jacquat A.C., Humphry M., Borel S., Petétot J.M., Métraux J.P. and Nawrath C. (2007) A permeable cuticle in Arabidopsis leads to a strong resistance to *Botrytis cinerea*. EMBO J 26:2158-2168.
- Bruce G., Gu M., Shi N., Liu Y. and Hong Y. (2011) Influence of retinoblastoma-related gene silencing on the initiation of DNA replication by African cassava mosaic virus Rep in cells of mature leaves in *Nicotiana benthamiana* plants. Virol J 8:561.
- Cao H., Bowling S.A., Gordon A.S. and Dong X. (1994)Characterization of an Arabidopsis mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. Plant Cell 6:1583-1592.
- Cao H., Glazebrook J., Clarke J.D., Volko S. and Dong X. (1997) The Arabidopsis NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. Cell 88:57-63.
- Casado-Díaza A., Encinas-Villarejoa S., Santosb B., Schilirò E., Yubero-Serrano E., Amil-Ruíz F., Pcovi M.I., Pliego-Alfaro F., Dorado G., Rey M., Romero F., Muñoz-Blanco J. and Caballero J. (2006) Analysis of strawberry genes differentially expressed in response to *Colletotrichum* infection. Physiol Plant 128:633-650.
- Chapman S., Kavanagh T. and Baulcombe D. (1992) Potato virus X as a vector for gene expression in plants. Plant J 2:549-557.
- Chen C. and Chen Z. (2002) Potentiation of developmentally regulated plant defense response by AtWRKY18, a pathogen-induced Arabidopsis transcription factor. Plant Physiol 129:706-716.
- Chen Q.G. and Bleecker A.B. (1995) Analysis of ethylene signal-transduction kinetics associated with seedling-growth response and chitinase induction in wild-type and mutant Arabidopsis. Plant Physiol 108:597-607.

- Cheng Q., Zhang B., Zhuge Q., Zeng Y., Wang M. and Huang M. (2006) Expression profiles of two novel lipoxygenase genes in *Populus deltoides*. Plant Sci 170:1027-1035.
- Chini A., Fonseca S., Fernández G., Adie B., Chico J.M., Lorenzo O., García-Casado G., López-Vidriero I., Lozano F.M., Ponce M.R., Micol J.L. and Solano R. (2007) The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. Nature 448:666-671.
- Conn S., Curtin C., Bézier A. Franco C. and Zhang W. (2008) Purification, molecular cloning, and characterization of glutathione S-transferases (GSTs) from pigmented Vitis vinifera L. cell suspension cultures as putative anthocyanin transport proteins. J Exp Bot 59:3621-3634.
- Prime-A-Plant Group, Conrath U., Beckers G.J., Flors
  V., García-Agustín P., Jakab G., Mauch F., Newman M.A., Pieterse C.M., Poinssot B., Pozo
  M.J., Pugin A., Schaffrath U., Ton J., Wendehenne
  D., Zimmerli L. andMauch-Mani B. (2006)
  Priming: getting ready for battle. Mol Plant
  Microbe Interact 19:1062-1071.
- Dao T.T., Linthorst H.J. and Verpoorte R. (2011) Chalcone synthase and its functions in plant resistance. Phytochem Rev 10:397-412.
- Darrow G. M. (1966) The Strawberry. Holt, Rinehart and Winston:pp. 119
- Dellagi A., Helibronn J., Avrova A.O., Montesano M., Palva E.T., Stewart H.E., Toth I.K., Cooke D.E., Lyon G.D. and Birch P.R. (2000) A potato gene encoding a WRKY-like transcription factor is induced in interactions with *Erwinia carotovora* subsp. atroseptica and *Phytophthora infestans* and is coregulated with class I endochitinase expression. Mol Plant Microbe Interact 13:1092-1101.
- Denoyes-Rothan B., Guérin G., Lerceteau-Köhler E. and Risser G. (2005) Inheritance of resistance to *Colletotrichum acutatum*in *Fragaria* × *ananassa*. Phytopathology 95:405-412.
- Dixon D.P. and Edwards R. (2010) Glutathione transferases. Arabidopsis Book 8:e0131.
- Encinas-Villarejo S., Maldonado A.M., Amil-Ruiz F., de los Santos B., Romero F., Pliego-Alfaro F.,

Muñoz-Blanco J. and Caballero J.L. (2009) Evidence for a positive regulatory role of strawberry (*Fragaria* x *ananassa*) Fa WRKY1 and Arabidopsis At WRKY75 proteins in resistance. J Exp Bot 60:3043-3065.

- Eswaran N., Parameswaran S., Sathram B., Anantharaman B., Kumar G. R.K. and Tangirala S.J. (2010) Yeast functional screen to identify genetic determinants capable of conferring abiotic stress tolerance in *Jatropha curcas*. BMC Biotechnol 10:23.
- Fan W. and Dong X. (2002) In vivo interaction between NPR1 and transcription factor TGA2 leads to salicylic acid–mediated gene activation in Arabidopsis. Plant Cell 14:1377-1389.
- Feys B., Benedetti C.E., Penfold C.N. and Turner J.G. (1984) Arabidopsis mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. Plant Cell 6:751-759.
- Fils-Lycaon B.R., Wiersma P.A., Eastwell K.C. and Sautiere P. (1996) A cherry protein and its gene, abundantly expressed in ripening fruit, have been identified as thaumatin-like. Plant Physiol 111:269-273.
- Fofana B., Benhamou N., McNally D.J., Labbé C., Séguin A. and Bélanger R.R. (2005) Suppression of induced resistance in cucumber through disruption of the flavonoid pathway. Phytopathology 95:114-123.
- Frye C.A., Tang D and Innes R.W. (2001) Negative regulation of defense responses in plants by a conserved MAPKK kinase. Proc Natl Acad Sci USA 98:373-378.
- Glazebrook J., Chen W., Estes B., Chang H.S., Nawrath C., Métraux J.P., Zhu T. and Katagiri F. (2003) Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. Plant J 34:217-228.
- Görlach J., Volrath S., Knauf-Beiter G., Hengy G., Beckhove U., Kogel K.H., Oostendorp M., Staub T., Ward E., Kessmann H. and Ryals J. (1996) Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. Plant

Cell 8:629-643.

- Griesser M., Hoffmann T., Bellido M.L., Rosati C., Fink B., Kurtzer R., Aharoni A., Muñoz-Blanco J. and Schwab W. (2008a) Redirection of flavonoid biosynthesis through the down-regulation of an anthocyanidin glucosyltransferase in ripening strawberry fruit. Plant Physiol 146:1528-1539.
- Griesser M., Vitzthum F., Fink B., Bellido M.L., Raasch C., Munoz-Blanco J. and Schwab W. (2008b) Multi-substrate flavonol O-glucosyltransferases from strawberry (*Fragaria×ananassa*) achene and receptacle. J Exp Bot 59:2611–2625.
- Hanhineva K., Kokko H., Siljanen H., Rogachev I., Aharoni A. and Kärenlampi S.O. (2009) Stilbene synthase gene transfer caused alterations in the phenylpropanoid metabolism of transgenic strawberry (*Fragaria* × *ananassa*). J Exp Bot 60:2093–2106.
- 橋田弘一・石川成寿・手塚紳浩 (1988) 栃木県にお けるイチゴ炭そ病の発生実態. 関東病虫研報 35:83-84.
- 橋本和紀・浜中悠・辻朋子・橋爪不二夫・小堀純 奈・森利樹・掛田克行 (2011) イチゴの萎黄病 抵抗性 DNA マーカーの連鎖分析. 園学研 11(別 2):423.
- 平島啓太・榎本亜紀子・片山貴雄・田代康介・平 川秀樹・石井貴明・芝戸靖志・三井寿一・平 田千春・池上秀利・中原隆夫・牟田滋・山本 潔・黒川小百合・龍俊輔・久原哲 (2009) トラ ンスクリプトーム解析によるイチゴ交雑後代 の炭疽病抵抗性識別. 園学研 8 (別 1):146.
- 平山喜彦・鈴木健・伊藤靖之・岡山健夫・西崎仁 博・松谷幸子 (2008a) 病原菌特異的プライマ ーを用いた PCR による潜在感染株からのイチ ゴ炭疽病菌の検出. 日植病報 74:198 (講要).
- 平山喜彦・川本優理子・松谷幸子・西崎仁博・岡山健夫 (2008b) 奈良県における薬剤耐性イチゴ炭疽病菌の発生状況.関西病虫研報 50:93-94.
- Hoffmann T., Kalinowski G. and Schwab W. (2006) RNAi-induced silencing of gene expression in strawberry fruit (*Fragaria* × ananassa) by agroinfiltration: a rapid assay for gene function analysis. Plant J 48:818-826.

本多藤雄・岩永喜裕・松田照男・森下昌三・伏原

肇 (1985) イチゴ新品種 'とよのか'の育種に 関する研究. 野菜試報 C8:39-57.

- Huang F.C. and Schwab W. (2011) Cloning and characterization of a 9-lipoxygenase gene induced by pathogen attack from *Nicotiana benthamiana* for biotechnological application. BMC Biotechnol 11:30.
- Huang X. and Madan A. (1999) CAP3: A DNA sequence assembly program. Genome Res 9:868-877.
- Huisman M.J., Linthorst H.J., Bol J.F. and Cornelissen J.C. (1988) The complete nncleotide sequence of Potato virus X and its homologies at the amino acid level with various plus-stranded RNA viruses. J Gen Virol 69:1789-1798.
- Huitema E., Vleeshouwers V.G., Cakir C., Kamoun S. and Govers F. (2005) Differences in intensity and specificity of hypersensitive response induction in Nicotiana spp. by INF1, INF2A, and INF2B of *Phytophthora infestans*. Mol Plant Microbe Interact 18:183-193.
- Ibraheem F., Gaffoor I. and Chopra S. (2010) Flavonoid phytoalexin-dependent resistance to anthracnose leaf blight requires a functional yellow seed1 in *Sorghum bicolor*. Genetics 184:915-926.
- 飯村一成・中澤佳子・天谷正行 (2011) イチゴ'ア スカウェイブ'における萎黄病耐病性に関す る連鎖解析. 育種学研究 13(別1):295.
- 稲田稔・石井英夫・Chung WH・山田 智子・山口 純一郎・古田明子 (2008) ストロビルリン系薬 剤 耐 性 イ チ ゴ 炭 疽 病 菌 〔 Colletotrichum gloeosporioides (Glomerella cingulata)〕の発生. 日植病報 74:114-117.
- 稲田稔・山口純一郎・古田明子 (2009) 佐賀県におけるベンズイミダゾール系薬剤およびジエトフェンカルブ剤 耐性イチゴ炭 疽病 菌 (Glomerella cingulata)の発生と各種薬剤の防除効果. 九病虫研報 55:31-36.
- International Rice Genome Sequencing Project (2005) The map-based sequence of the rice genome. Nature 436:793-800.
- 石川成寿・中山喜一・大兼善三郎 (1989a) イチゴ 炭そ病に関する研究 第 2 報 本病菌の越冬 形態について. 栃木農試研報 36:37-42.

石川成寿・田村恭志・中山喜一・大兼善三郎 (1989b)

イチゴ炭そ病に関する研究 第4報 イチゴ 炭そ病の防除法.栃木農試研報 36:49-58.

- 石川成寿・萩原廣・中山喜一・国安克人 (1990) 罹 病残渣の嫌気的発光によるイチゴ炭そ病菌の 不活化. 関東病虫研報 37:111-112.
- 石川成寿・中山喜一・常見譲史 (1993) ポット育苗 時の底面給水法によるイチゴ炭そ病の蔓延職 制効果及び本病菌分生胞子の飛散に及ぼす風 と水の影響. 関東病虫研報 40:63-68.
- 石川成寿・山崎周一郎・大野義文 (1996) イチゴ炭 そ病に対する粒状薬剤の防除効果. 関東病虫 研報 43:95-97.
- Ishikawa S. (2003) Method to diagnose latent infection by *Glomerella cingulata* in strawberry plants using ethanol. J Gen Plant Pathol 69:372-377.
- 石川成寿 (2005) イチゴ炭疽病の病原菌, 生態なら びに環境に配慮した防除技術の開発. 栃木農 試研報 54:1-187.
- 石川正美・前田ふみ・丸尾達 (2008) 千葉 F-1 号. 品 種登録出願 23222.
- 石原良行・高野邦治・植木正明・栃木博美 (1996) イ チゴ新品種「とちおとめ」の育成. 栃木農試研 報 44:109-123.
- Jaulneau V., Cazaux M., Hoi J.W.S., Fournier S., Esquerré-Tugayé M., Jacquet C. and Dumas B. (2010) Host and nonhost resistance in *Medicago–Colletotrichum Interactions*. Mol Plant Microbe Interact 23:1107-1117.
- Jelkmann W., Maiss E. and Martin R.R. (1992) The nucleotide sequence and genome organization of strawberry mild yellow edge-associated potexvirus. J Gen Virol 73:475-47.
- Jung S., Staton M., Lee T., Blenda A., Svancara R., Abbott A. and Main D. (2008) GDR (Genome Database for Rosaceae): integrated web-database for Rosaceae genomics and genetics data. Nucleic Acids Res 36:D1034-D1040.
- Kang J.H., Wang L., Giri A. and Baldwin I.T. (2006) Silencing threonine deaminase and JAR4 in *Nicotiana attenuata*impairs jasmonic acid– isoleucine–mediated defenses against *Manduca sexta*. Plant Cell 18:3303-3320.
- Khan A.A. and Shih D.S. (2004) Molecular cloning, characterization, and expression analysis of two class II chitinase genes from the strawberry plant.

Plant Sci 166:753-762.

- 木庭卓人・狩野有香・石川正美 (2007) イチゴの減 数分裂-種子繁殖性イチゴ品種の育成に向け て-. 食と緑の科学 61:61-65.
- Kim K.C., Lai Z., Fan B. and Chen Z. (2008) Arabidopsis WRKY38 and WRKY62 transcription factors interact with histone deacetylase 19 in basal defense. Plant Cell 20:2357-2371.
- Ko T.S., Lee S., Schaefer S.C. and Korban S.S. (2003) Characterization of a tissue-specific and developmentally regulated β-1,3-glucanase gene family in Prunus persica. Plant Physiol Biochem 41:955-963.
- Kubota K., Tsuda S., Tamai A. and Meshi T. (2003) Tomato mosaic virus replication protein suppresses virus-targeted posttranscriptional gene silencing. J Virol 77:11016-11026.
- 國久美由紀 (2008) 栽培イチゴにおけるゲノム特 異的 DNA マーカーの開発と品種識別技術へ の応用. 筑波大学大学院生命環境科学研究科 博士(農学)学位論文
- Lamprecht S. and Jelkmann W. (1997) Infectious cDNA clone used to identify strawberry mild yellow edge-associated potexvirus as causal agent of the disease. J Gen Virol 78:2347-2353.
- Leercetea-Köhler E., Guérin G. and Denoyes-Rothan B. (2005) Identification of SCAR markers linked to *Rca2* anthracnose resistance gene and their assessment in strawberry germplasm. Theor Appl Genet 111:862-870.
- Leitner-Dagan Y., Ovadis M., Shklarman E., Elad Y., Rav David D. and Vainstein A. (2006) Expression and functional analyses of the plastid lipid-associated protein CHRC suggest its role in chromoplastogenesis and stress. Plant Physiol 142:233-244.
- Lerceteau-Köhler E., Guérin G., Laigret F. and Denoyes-Rothan B. (2003) Characterization of mixed disomic and polysomic inheritance in the octoploid strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) using AFLP mapping. Theor Appl Genet 107:619-628.
- Li L., Zhao Y., McCaig B.C., Wingerd B.A., Wang J., Whalon M.E., Pichersky E. and Howe G.A. (2004) The tomato homolog of CORONATINE-INSENSITIVE1 is required for the maternal

control of seed maturation, jasmonate-signaled defense responses, and glandular trichome development. Plant Cell 16:126-143.

- Li J., Brader G. and Palva E.T. (2004) The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. Plant Cell 16:319-331.
- Li C., Zhang K., Zeng X., Jackson S., Zhou Y. and Hong Y. (2008) A cis element within flowering locus T mRNA determines its mobility and facilitates trafficking of heterologous viral RNA. J Virol 83:3540-3548.
- Lindbo J.A. (2007) High-efficiency protein expression in plants from agroinfection-compatible Tobacco mosaic virus expression vectors. BMC Biotechnol 7:52.
- Liu C.J., Deavours B.E., Richard S.B., Ferrer J.L., Blount J.W., Huhman D., Dixon R.A. and Noel J.P. (2006) Structural basis for dual functionality of isoflavonoid O-methyltransferases in the evolution of plant defense responses. Plant Cell 18:3656-3669.
- Lu H.C., Chen H.H., Tsai W.C., Chen W.H., Su H.J., Chang D.C. and Yeh H.H. (2007) Strategies for functional validation of genes involved in reproductive stages of orchids. Plant Physiol 143:558-569.
- Lunkenbein S., Coiner H., de Vos C.H., Schaart J.G., Boone M.J., Krens F.A., Schwab W. and Salentijn E.M. (2006) Molecular characterization of a stable antisense chalcone synthase phenotype in strawberry (*Fragaria x ananassa*). J Agric Food Chem 54:2145-2153.
- Marrs K.A. (1996) The functions and regulation of glutathione s-transferases in plants. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 47:127-158.
- Mauch-Mani B. and Slusarenko A.J. (1996) Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of Arabidopsis to *Peronospora parasitica*. Plant Cell 8:203-212.
- Martin R.R. and Tzanetakis I.E. (2006) Characterization and recent advances in detection of strawberry viruses. Plant Dis 90:384-396.

Meins F. Jr. and Ahl P. (1989) Induction of chitinase

and  $\beta$ -1,3-glucanase in tobacco plants infected with *Pseudomonas tabaci* and *Phytophthora parasitica* var. Nicotianae. Plant Sci 61:155-161.

- 森利樹・戸谷孝・藤原孝之 (2000) 炭そ病抵抗性イ チゴ新品種 'サンチーゴ'の育成. 三重農技研 報 27:27-36.
- 森利樹 (2001) イチゴにおける炭そ病抵抗性の遺 伝と選抜反応. 三重農技研報 28:15-21.
- Mori T., Kitamura H. and Kuroda K. (2005) Varietal differences in Fusarium wilt-resistance in strawberry cultivars and the segregation of this trait in F1 hybrids. J Japan Soc Hort Sci 74:57-59.
- 森利樹・北村八祥 (2008) かおり野. 品種登録出願 22218.
- 向井譲・山本直樹 (1997) 新版植物の PCR 実験プロトコール. 秀潤社 pp. 60-62.
- 直井昌彦・畠山昭嗣・岡村昭子・稲葉幸雄・植木 正明 (2008) イチゴの閉鎖型養液栽培に適し た培養液処方. 栃木農試研 63:59-68
- Narusaka Y., Narusaka M., Park P., Kubo Y., Hirayama T., Seki M., Shiraishi T., Ishida J., Nakashima M., Enju A., Sakurai T., Satou M., Kobayashi M. and Shinozaki K. (2004) *RCH1*, a locus in Arabidopsis that confers resistance to the hemibiotrophic fungal pathogen *Colletotrichum higginsianum*. Mol Plant Microbe Interact 17:749-762.
- Nishiyama R., Watanabe Y., Fujita Y., Le D.T., Kojima M., Werner T., Vankova R., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K., Kakimoto T., Sakakibara H., Schmülling T. and Tran L.S. (2011) Analysis of cytokinin mutants and regulation of cytokinin metabolic genes reveals important regulatory roles of cytokinins in drought, salt and abscisic acid responses, and abscisic acid biosynthesis. Plant Cell 23:2169-2183.
- 山中達・山口富夫 (1987) 稲いもち病. 養賢堂 pp. 223-224, 241-242
- Norman-Setterblad C., Vidal S. and Palva E.T. (2000) Interacting signal pathways control defense gene expression in Arabidopsis in response to cell wall-degrading enzymes from *Erwinia carotovora*. Mol Plant Microbe Interact 13:430-438.
- 岡山健夫 (1989) 奈良県におけるイチゴ炭そ病の 発生実態と薬剤防除について. 奈良農試研報 20:79-86.

- 岡山健夫 (1993) 加温によるイチゴ炭そ病潜在感 染株の検定. 奈良農試研報 24:41-46.
- 岡山健夫 (1994) イチゴ炭そ病菌 Glomerella cingulata (=Colletotrichum gloeosporioides) 分生 子の飛散および障壁による防除効果. 日植病 報 60:113-118.
- 岡山健夫・平山喜彦・西崎仁博 (2007) 選択培地に よるベノミル剤耐性イチゴ炭疽病菌 *Glomerella cingulata*の潜在感染株及び育苗培 養土からの検出. 日植病報 73:155-161.
- 沖村誠・野口裕司・望月龍也・曽根一純・北谷恵 美 (2004) 炭疽病抵抗性の いちご中間母本農 2 号'. 園学研 3:257-260.
- 沖村誠・曽根一純・野口裕司・望月龍也・北谷恵 美 (2008) カレンベリー. 品種登録出願 22564.
- Orzaez D., Mirabel S., Wieland W.H. and Granell A. (2006) Agroinjection of tomato fruits. A tool for rapid functional analysis of transgenes directly in fruit. Plant Physiol 140:3-11.
- Pieterse C.M.J. and Van Loon L.C. (2004) NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. Curr Opin Plant Biol 7:456-464.
- Pieterse C.M.J., Ton J. and Van Loon L.C. (2001) Cross-talk between plant defence signalling pathways: boost or burden?. AgBiotechNet 3:ABN068.
- Pilotti M.,. Brunetti A, Gallelli A. and Loreti S. (2008) NPR1-like genes from cDNA of rosaceous trees: cloning strategy and genetic variation. Tree Genet. Genomes 4:49-63.
- Prats E., Martínez F., Rojas-Molina M.M. and Rubiales D. (2007) Differential effects of phenylalanine ammonia lyase, cinnamyl alcohol dehydrogenase, and energetic metabolism inhibition on resistance of appropriate host and nonhost cereal–rust interactions. Phytopathology 97:1578-1583.
- Qiu D., Xiao J., Ding X., Xiong M., Cai M., Cao Y., Li X., Xu C. and Wang S. (2007) OsWRKY13 mediates rice disease resistance by regulating defense-related genes in salicylate- and jasmonate-dependent signaling. Mol Plant Microbe Interact 20:492-499.
- Reddy A.S. and Poovaiah B.W. (1990) Molecular cloning and sequencing of a cDNA for an auxin-repressed mRNA: correlation between fruit

growth and repression of the auxin-regulated gene. Plant Mol Biol 14:127-136.

- Salvatierra A., Pimentel P., Moya-Leon M.A., Caligari P.D. and Herrera R. (2010) Comparison of transcriptional profiles of flavonoid genes and anthocyanin contents during fruit development of two botanical forms of *Fragaria chiloensis* ssp. Chiloensis. Phytochemistry 71:1839-1847.
- Schaffrath U., Freydl E. and Dudler R. (1997) Evidence for different signaling pathways activated by inducers of acquired resistance in wheat. Mol Plant Microbe Interact 10:779-783.
- Seo P.J., Lee S.B., Suh M.C., Park M.J., Go Y.S. and Park C.M. (2011) The MYB96 transcription factor regulates cuticular wax biosynthesis under drought conditions in Arabidopsis. Plant Cell 23:1138-1152.
- Shi Y., Zhang Y. and Shih D.S. (2006) Cloning and expression analysis of two  $\beta$ -1,3-glucanase genes from Strawberry. J Plant Physiol 163:956-967.
- Shibuya K., Barry K.G., Ciardi J.A., Loucas H.M., Underwood B.A., Nourizadeh S., Ecker J.R., Klee H.J. and Clark D.G. (2004) The central role of PhEIN2 in ethylene responses throughout plant development in petunia. Plant Physiol 136:2900-2912.
- Shimono M., Sugano S., Nakayama A., Jiang C.J., Ono K., Toki S. and Takatsuji H. (2007) Rice WRKY45 plays a crucial role in benzothiadiazole-inducible blast resistance. Plant Cell 19:2064-2076.
- Shulaev V., Sargent D.J., Crowhurst R.N., Mockler T.C., Folkerts O., Delcher A.L., Jaiswal P., Mockaitis K., Liston A., Mane S.P., Burns P., Davis T.M., Slovin J.P., Bassil N., Hellens R.P., Evans C., Harkins T., Kodira C., Desany B., Crasta O.R., Jensen R.V., Allan A.C., Michael T.P., Setubal J.C., Celton J.M., Rees D.J., Williams K.P., Holt S.H., Ruiz Rojas J.J., Chatterjee M., Liu B., Silva H., Meisel L., Adato A., Filichkin S.A., Troggio M., Viola R., Ashman T.L., Wang H., Dharmawardhana P., Elser J., Raja R., Priest H.D., Bryant D.W. Jr, Fox S.E., Givan S.A., Wilhelm L.J., Naithani S., Christoffels A., Salama D.Y., Carter J., Lopez Girona E., Zdepski A., Wang W., Kerstetter R.A., Schwab W., Korban S.S., Davik J., Monfort Α.,

Denoyes-Rothan B., Arus P., Mittler R., Flinn B., Aharoni A., Bennetzen J.L., Salzberg S.L., Dickerman A.W., Velasco R., Borodovsky M., Veilleux R.E. and Folta K.M. (2011) The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). Nat Genet 43:109-116.

- Spolaore S., Trainotti L. and Casadoro G. (2001) A simple protocol for transient gene expression in ripe fleshy fruit mediated by Agrobacterium. J Exp Bot 52:845-850.
- Staswick P.E. and Tiryaki I. (2004) The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in Arabidopsis. Plant Cell 16:2117-2127.
- Staswick P.E., Tiryaki I. and Rowe M.L. (2002) Jasmonate response locus JAR1 and several related Arabidopsis genes encode enzymes of the firefly luciferase superfamily that show activity on jasmonic, salicylic, and indole-3-acetic acids in an assay for adenylation. Plant Cell 14:1405-1415.
- 鈴木健・田中千華・伊藤靖之・植松清次・平山喜 彦・岡山健夫 (2008) イチゴ炭疽病に対する特 異的プライマーのプライマーの作成. 日植病 報 74:198 (講要).
- 鈴木健・田中千華・吉田菜々子・植松清次 (2010) イ チゴ小葉を用いたイチゴ炭疽病菌の簡易病原 性判定法. 関東病虫研報 57:31-34.
- 高村佳明 (2010) イチゴマイルドイエローエッジ ウイルスの遺伝子解析とベクター化. 宇都宮 大学院農学研究科生物生産科学専攻修士論文.
- Tampakaki A.P. and Panopoulos N.J. (2000) Elicitation of hypersensitive cell death by extracellularly targeted HrpZPsph produced in planta. Mol Plant Microbe Interact 13:1366-1374.
- 田中千華・鈴木健・海老原克介・植松清次 (2009) ラ ンナー切片を利用したイチゴ炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides* の病原性簡易検 定法. 関東病虫研報 56:25-27.
- 手塚信夫・牧野孝宏 (1989) イチゴ炭そ病の発生様 相と防除. 関東病虫研報 36:92-94.
- Thines B., Katsir L., Melotto M., Niu Y., Mandaokar A., Liu G., Nomura K., He S.Y., Howe G.A. and Browse J. (2007) JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signalling. Nature 448:661-665.

- Thomma B.P., Eggermont K., Penninckx I.A., Mauch-Mani B., Vogelsang R., Cammue B.P. and Broekaert W.F. (1998) Separate jasmonatedependent and salicylate-dependent defenseresponse pathways in Arabidopsis are essential for resistance to distinct microbial pathogens. Proc Natl Acad Sci USA 95:15107-15111.
- Thomma B.P., Eggermont K., Tierens K.F. and Broekaert W.F. (1999) Requirement of functional ethylene-insensitive 2 gene for efficient resistance of Arabidopsis to infection by *Botrytis cinerea*. Plant Physiol 121:1093-1102.
- Uknes S., Mauch-Mani B., Moyer M., Potter S., Williams S., Dincher S., Chandler D., Slusarenko A., Ward E. and Ryals J. (1992) Acquired Resistance in Arabidopsis. Plant Cell 4:645-656.
- Umezawa T., Nakashima K., Miyakawa T., Kuromori T., Tanokura M., Shinozaki K. and Yamaguchi-Shinozaki K. (2010) Molecular basis of the core regulatory network in ABA responses: sensing, signaling and transport. Plant Cell Physiol 51:1821-1839.
- Van der Hoorn R.A., Laurent F., Roth R. and De Wit P.J. (2000) Agroinfiltration is a versatile tool that facilitates comparative analyses of Avr9/Cf-9induced and Avr4/Cf-4-induced necrosis. Mol Plant Microbe Interact 13:439–446.
- van Peer R., Niemann G.J. and Schippers B. (1991) Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of Fusarium wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r. Phytopathology 81:728-734.
- Vellicce G.R., Ricci J.C., Hernández L. and Castagnaro A.P. (2006) Enhanced resistance to *Botrytis cinerea* mediated by the transgenic expression of the chitinase gene ch5B in strawberry. Transgenic Res 15:57-68.
- Venisse J.S., Malnoy M., Faize M., Paulin J.P. and Brisset M.N. (2002) Modulation of defense responses of *Malus* spp. during compatible and incompatible interactions with *Erwinia amylovora*. Mol Plant Microbe Interact 15:1204-1212.
- Vick B.A. and Zimmerman D.C. (1984) Biosynthesis of jasmonic Acid by several plant species. Plant Physiol 75:458-461.

- Vögeli-Lange R., Hansen-Gehri A., Boller T. and Meins F. Jr. (1988) Induction of the defense-related glucanohydrolases, β-1,3-glucanase and chitinase, by tobacco mosaic virus infection of tobacco leaves. Plant Sci 54:171-176.
- Ward E.R., Payne G.B., Moyer M.B., Williams S.C., Dincher S.S., Sharkey K.C., Beck J.J., Taylor H.T., Ahl-Goy P., Meins F and Ryals J.A. (1991)
  Differential regulation of β-1,3-glucanase messenger RNAs in response to pathogen infection. Plant Physiol 96:390-397.
- Wei G., Kloepper J.W. and Tuzun S. (1991) Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth-promoting rhizobacteria. Phytopathology 81:1508-1512.
- Woloshuk C.P., Meulenhoff J.S., Sela-Buurlage M., van den Elzen P.J. and Cornelissen B.J. (1991) Pathogen-induced proteins with inhibitory activity toward *Phytophthora infestans*. Plant Cell 3:619-628.
- Wong S.M., Mahtani P.H., Lee K.C., Yu H.H., Tan Y., Neo K.K., Chan Y., Wu M. and Chng C.G. (1997) Cymbidium mosaic potexvirus RNA: complete nucleotide sequence and phylogenetic analysis. Arch Virol 142:383-391.
- Xie D.X., Feys B.F., James S., Nieto-Rostro M. and Turner J.G. (1998) COI1: an Arabidopsis gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. Science 280:1091-1094.
- Xiong R., Wu J., Zhou Y. and Zhou X. (2008) Identification of a movement protein of the tenuivirus rice stripe virus. J Virol 82:12304-12311.
- Yasuda M., Ishikawa A., Jikumaru Y., Seki M., Umezawa T., Asami T., Maruyama-Nakashita A., Kudo T., Shinozaki K., Yoshida S. and Nakashita H. (2008) Antagonistic interaction between systemic acquired resistance and the abscisic acid–mediated abiotic stress response in Arabidopsis. Plant Cell 20:1678-1692.

- 安田美智子・仲下英雄 (2009) 植物の全身獲得抵抗 性を制御する植物ホルモンネットワーク. 化 学と生物 47:553-559.
- 山岸紀子・吉川信幸 (2010) 植物ウイルスベクター を用いた遺伝子機能解析ツールとしてのウイ ルス誘導ジーンサイレンシング.ウイルス 60:155-162.
- 米本謙悟・三木敏史・広田恵介・板東 一宏 (2008) 親水性不織布を利用した灌水法のイチゴ炭疽 病に対する防除効果. 日植病報 74:328-334.
- Yoshida Y., Koyama N. and Tamura H. (2002) Color and anthocyanin composition of strawberry fruit : changes during fruit development and differences among cultivars, with special reference to the occurrence of pelargonidin 3-malonylglucoside. J Japan Soc Hort Sci 71:355-361.
- Yoshioka K., Nakashita H., Klessig D.F. and Yamaguchi I. (2001) Probenazole induces systemic acquired resistance in Arabidopsis with a novel type of action. Plant J 25:149-157.
- Yu D., Chen C. and Chen Z. (2001) Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of NPR1 gene expression. Plant Cell 13:1527-1539.
- Zhang D., Hrmova M., Wan C.H., Wu C., Balzen J., Cai
  W., Wang J., Densmore L.D., Fincher G.B., Zhang
  H. and Haigler C.H. (2004) Members of a new
  group of chitinase-like genes are expressed
  preferentially in cotton cells with secondary walls.
  Plant Mol Biol 54:353-372.
- Zimmermann M.C., Tilghman S.L., Boué S.M., Salvo
  V.A., Elliott S., Williams K.Y., Skripnikova E.V.,
  Ashe H., Payton-Stewart F., Vanhoy-Rhodes L.,
  Fonseca J.P., Corbitt C., Collins-Burow B.M.,
  Howell M.H., Lacey M., Shih B.Y.,
  Carter-Wientjes C., Cleveland T.E., McLachlan
  J.A., Wiese T.E., Beckman B.S. and Burow M.E..
  (2010) Glyceollin I, a novel antiestrogenic
  phytoalexin isolated from activated soy. J
  Pharmacol Exp Ther 332:35-45.

別表 1

プライマー名	配列(5'→3'):制限酵素認識配列(下線)	, 使用した実験,
シーケンス用ユニ	<u>後乗導入部位(コンツクム</u> バーサルプライマー	.子/
M13-47	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC	第3章2-1-3(2),第5章3-1-1(3)
dT18V	TTTTTTTTTTTTTTTT(A/G/C)	第3章2-1-3 (2)
T3	ATTAACCCTCACTAAAGGGA	第3章2-1-3 (2)
Τ7	GTAATACGACTCACTATAGGGC	第3章2-1-3 (2)
SP6	ATTTAGGTGACACTATAGAA	第3章2-1-3 (2)
シーケンス用cDNA	配列特異的プライマー	
Str025E07_GS-f	GACCGAATTTGCATTGATGTT	第3章2-1-3 (2)
Str025E07_GS-r	ACAAATCAGGCAGGTCATCC	第3章2-1-3(2)
Str040D05_GS-f	GGGATTGCAGTGGGTAATGAA	第3章2-1-3 (2)
Str002A03_GS-f	TGTTACTTCGGGCTATTGTGG	第3章2-1-3 (2)
Str002A03_GS-r	TCTTTGAGACCCCCGAAATAC	第3章2-1-3 (2)
Str001G07_GS-f	TTGCCTTTGTTGAGTGCTGATT	第3章2-1-3 (2)
Stg005C01_GS-f	GTATCATTCTTGGTGGGCTTCC	第3章2-1-3 (2)
リアルタイムRT-P	CR用プライマー(防御応答遺伝子)	
Str025E07_RT-f	TTGATGTACGCCTCTTCCATTTT	第3章3-1-5, 4-1-2, 5-1-2, 6-1-4
Str025E07_RT-r	GGCGTCGCTGGAATACTGA	第3章3-1-5, 4-1-2, 5-1-2, 6-1-4
Str014B05_RT-f	GGAGCACAACAAGCAGATAAATGA	第3章3-1-5,6-1-4
Str014B05_RT-r	TCTGTATCACCCGCATGTGAA	第3章3-1-5,6-1-4
Suk018F08_RT-f	TTATGTTCGCTGTGATGTCTCTGA	第3章3-1-5, 4-1-2, 5-1-2, 6-1-4
Suk018F08_RT-r	TTCCTCCATTGAAATCCATCCT	第3章3-1-5, 4-1-2, 5-1-2, 6-1-4
Stg042B12_RT-f	CATGCTTGGTGTCGAAAACG	第3章3-1-5, 5-1-2, 6-1-4
Stg042B12_RT-r	CAGCACTGGCCTGGTTAGAAG	第3章3-1-5, 5-1-2, 6-1-4
Str040D05_RT-f	GAGGAAGAAGGAGCGCTGTGT	第3章3-1-5,6-1-4
Str040D05_RT-r	GGACCAAACAAAGGGCAAGA	第3章3-1-5,6-1-4
Stg021F11_RT-f	GACCAGTGCCCTCAGGCTTA	第3章3-1-5, 4-1-2, 5-1-2, 6-1-4
Stg021F11_RT-r	CGAAGCATGTAAAGAGGCTGTTC	第3章3-1-5, 4-1-2, 5-1-2, 6-1-4
Stg031F08_RT-f	GTGTTGGCACCCCAAGCTA	第3章3-1-5, 5-1-2, 6-1-4
Stg031F08_RT-r	CAGAAGCGGCCATTCCAT	第3章3-1-5, 5-1-2, 6-1-4
Str002A03_RT-f	TGGCGCTTCGACATGGA	第3章3-1-5, 4-1-2, 5-1-2, 6-1-4
Str002A03_RT-r	TCAACTGCCATTCCCCTTCT	第3章3-1-5, 4-1-2, 5-1-2, 6-1-4
Str001G07_RT-f	CAACATCAACATCGACAAGAACAC	第3章3-1-5, 4-1-2, 6-1-4
Str001G07_RT-r	AGCTTGGCTGCCTCTTCAAC	第3章3-1-5, 4-1-2, 6-1-4
Sut014H09_RT-f	TGGCGTTCGAGCTCTATTGA	第3章3-1-5, 6-1-4
Sut014H09_RT-r	GGACGGAGATACAAAGCAAACC	第3章3-1-5,6-1-4
Stg005C01_RT-f	GGGTTCTGGGACTACAAGTCGTT	第3章3-1-5, 4-1-2, 6-1-4
Stg005C01_RT-r	CAAAACCCCTGAGGCTGAAA	第3章3-1-5, 4-1-2, 6-1-4
Stg017G02_RT-f	TGCAGGCCAAGTGGATTCTT	第3章3-1-5, 4-1-2, 6-1-4
Stg017G02_RT-r	CCGITCACATTTTGCACTACGA	第3草3-1-5, 4-1-2, 6-1-4
Suk011A06_RT-f	GIIGGCAGCCCTGCTACTG	第3草3-1-5, 6-1-4
Suk011A06_RT-r	TCITGAAGCAGCAACACGTAAAA	第3草3-1-5, 6-1-4
Str024G02_RT-f	GTCATCACGATTGGAGCTGAGA	第3章3-1-5, 4-1-2, 5-1-2, 6-1-4
Str024G02_RT-r	CCAATGAGAGATGGTTGGAAGAG	第3章3-1-5, 4-1-2, 5-1-2, 6-1-4

別表 1(続き)

プライマー名	配列(5'→3'):制限酵素認識配列(下線),	使用した実験,
	変異導入部位(ゴシック太字)	認識制限酵素,導入変異
リアルタイムRT-PO	CR用プライマー(マイクロアレイ選抜遺伝子)	
Stf019H06_RT-f	AGCAGGCCTGGCAGTGATA	第4章2-7
Stf019H06_RT-r	AGTGCCGCCCGAATGTT	第4章2-7
Stf031G10_RT-f	AAGCATTCATCATCAGCAACCA	第4章2-7
Stf031G10_RT-r	TATGACGTTGCCGGAGAGAGA	第4章2-7
Stg006A01_RT-f	GGGCACTCTGGCGCAAT	第4章2-7
Stg006A01_RT-r	CTATTCCTGGTTCTCGGTGTATGA	第4章2-7
Stg022H05_RT-f	CTCGAAATCCGAAGCTCTTGA	第4章2-7
Stg022H05_RT-r	GCAGCAATGCCGAATCGT	第4章2-7
Stg027B04_RT-f	GGCAAGGGCGACAAGAAGA	第4章2-7
Stg027B04_RT-r	ACTCTAAGCAACCAAGAGAAATCGA	第4章2-7
Stg038H01_RT-f	CGAAGGCTCGCCGAAA	第4章2-7
Stg038H01_RT-r	TTCCGGTTGGAGGATTTGAA	第4章2-7
Stg042B12_RT-f	CATGCTTGGTGTCGAAAACG	第4章2-7
Stg042B12_RT-r	CAGCACTGGCCTGGTTAGAAG	第4章2-7
Stg051C09_RT-f	CGGAACCTTTCCTGCAACA	第4章2-7
Stg051C09_RT-r	GATTCAGACCATGAAGCACTGTGT	第4章2-7
Stg051D02_RT-f	GGTGATCCTTTTGGTTTTGGTACT	第4章2-7
Stg051D02_RT-r	GCGGTTAGCACCGTGTATGG	第4章2-7
Str012A08_RT-f	CGCCGCCAGGATGTTCT	第4章2-7
Str012A08_RT-r	CCACAGGGTCCTCCTTATTGG	第4章2-7
Str017G08_RT-f	CGCTCTTTCTGTTCGCAATTT	第4章2-7
Str017G08_RT-r	GGCTGTGAAGGAGGGACTTG	第4章2-7
Str021H07_RT-f	TGTGTTACAAAGGCTCCAACTGAA	第4章2-7
Str021H07_RT-r	TGGGCGCCACAACCA	第4章2-7
Str031F12_RT-f	TCAGTCGTCCCGTATCCAATG	第4章2-7
Str031F12_RT-r	TGATTGTGGGACGCACCTT	第4章2-7
Str034F11_RT-f	TCCTGGCTCTGCCTGAACA	第4章2-7
Str034F11_RT-r	TCCCACCACGGACTTTCTTC	第4章2-7
Str035B01_RT-f	GAACATCTTCCGTGGATTCCA	第4章2-7
Str035B01_RT-r	CCCGTGCACCACGATGA	第4章2-7
Str035F01_RT-f	CTCCCGCGACAATTCCAT	第4章2-7
Str035F01_RT-r	CCTGCACCACCAATTGCA	第4章2-7
Str036B01_RT-f	AACAAGTTGGAGAGGTGTCTGGTT	第4章2-7
Str036B01_RT-r	GATCCTCGAGTCCACTCACAATT	第4章2-7
Str041A05_RT-f	AGAACTGGAAGTCCGGAGATTTT	第4章2-7
Str041A05_RT-r	TCGCTGCATGACGACTGTCT	第4章2-7
Stg010A01_RT-f	CGACGAAGATGACTGAACAAAGA	第4章2-7
Stg010A01_RT-r	AGGGTTTGCATCTGAGTTTGCT	第4章2-7
Stg015E02_RT-f	TCGACATGGACGACACTGCTA	第4章2-7
Stg015E02_RT-r	CGCCTCCTACTGAAAGAGTTGAG	第4章2-7
Stg017E04_RT-f	TTGCAGCAGTAGCAGCAGAAC	第4章2-7
Stg017E04_RT-r	CTACAGATGTGAAGCATGTGACACA	第4章2-7
Stg041A07_RT-f	TCACATGGGCCGGTTAATCT	第4章2-7
Stg041A07_RT-r	GGCTCTTGTTGGTTCTTCATAAGTT	第4章2-7
Stg041E02_RT-f	CATGCACTTCTCCAGCAGCTT	第4章2-7
Stg041E02_RT-r	TGAGTGGCGTGCGGACTT	第4章2-7
Stg045B01_RT-f	GGCCACCAAGTACATGTAGTCATC	第4章2-7
stg045B01_RT-r	AAGGCTGTGGACTAGAAAATGTCA	第4章2-7
Stg047A07_RT-f	TCCAGAAGCGGCCTAGAATG	第4章2-7
Stg047A07_RT-r	TGCGTTGGAAAAAACAGCAA	第4章2-7
Stg051G12_RT-f	CCTCCAGCAGGGAATACTAGCTT	第4章2-7
Stg051G12_RT-r	CCCCGCATGAAAGTTGGTA	第4章2-7
別表 1(続き)

プライマー名	配列(5'→3'):制限酵素認識配列(下線),	使用した実験,
	変異導入部位(ゴシック太宇	Z) 認識制限酵素,導入変異
リアルタイムRT-PC	CR用プライマー(マイクロアレイ選抜遺伝子	)
Str008A11_RT-f	CCATGGTGAAGAAGAGGAGATTG	第4章2-7
Str008A11_RT-r	TCCAGAAGCACTGCCTCACTT	第4章2-7
Str013A01_RT-f	GGCACAAAACGGGCAAGA	第4章2-7
Str013A01_RT-r	TGAAACCCTTGACTGCTCCAT	第4章2-7
Str026A12_RT-f	TTTTGCAATACAACTGCTACACTCTTT	第4章2-7
Str026A12_RT-r	TTTGTGCAACCATTATGCTTGTT	第4章2-7
Str047C10_RT-f	CTCCTGGAAAAGAGCGAGTCA	第4章2-7
Str047C10_RT-r	CCAGAGGAAACCTCAGTTGCA	第4章2-7
Suk015E12_RT-f	GGGAATAGCCGAGCTTGTGA	第4章2-7
Suk015E12_RT-r	GAGCTCATCCCTCAGCTTCTTC	第4章2-7
Stg005H10_RT-f	CCGCGAATGTGATGTTGTTG	第4章2-7
Stg005H10_RT-r	TCGCCGCTTCTCATCTTCAT	第4章2-7
Stg027A08_RT-f	CCAGGACCAAAAGGCTTGATC	第4章2-7
Stg027A08_RT-r	CCCTCCTGCAAATTCATGTAATT	第4章2-7
Stg031E03_RT-f	CTTGGCATCTGCAGCATCA	第4章2-7
Stg031E03_RT-r	CACGTGGCTTTGGGTTTGT	第4章2-7
Stg034D12_RT-f	TCAAGGGCTGAGGGACCTT	第4章2-7
Stg034D12_RT-r	CTGGACCTCAGCCTGAACGT	第4章2-7
Stg037B07_RT-f	CCCTCGGGCGAGCAAT	第4章2-7
Stg037B07_RT-r	CTGCATGGAAATGAAAGATGGA	第4章2-7
Stg044E09_RT-f	AAGCCACCGAGGAGATCCA	第4章2-7
Stg044E09_RT-r	CTTGCCCCATCGACACACT	第4章2-7
Stg050E06_RT-f	ATTGCAAACCGAGAACAGCAT	第4章2-7
Stg050E06_RT-r	GGTCGAGGGCCTTTTGGT	第4章2-7
Stg051E07_RT-f	CCGCGAATGTGATGTTGTTG	第4章2-7
Stg051E07_RT-r	GCCGCTGCTCATCTTCATG	第4章2-7
Stg077B02_RT-f	GCAACCTCGCCTTTGTCAAG	第4章2-7
Stg077B02_RT-r	CGTGACGCCCGGATTG	第4章2-7
Stl013B11_RT-f	CGGACATAAAGATCGGTTCCA	第4章2-7
Stl013B11_RT-r	ATGGTGGCCGGAATGAAA	第4章2-7
Str004H11 RT-f	TTTTGCGCGGAGGACTTC	第4章2-7
	GATGCTCCTCATCGATGTGACA	第4章2-7
Suk015C04_RT-f	AGCCATGCGATGTCACCAT	第4章2-7
Suk015C04 RT-r	CAAAAGACCTGAGGGCAGTCA	第4章2-7
Suk017G09 RT-f	CGACGGCAACGCTCATC	第4章2-7
Suk017G09 RT-r	GCCAGATCCCAGAGAGACTGA	第4章2-7
Suk019F12 RT-f	CATATACCATGCCAGAGAATCAATG	第4章2-7
Suk019F12 RT-r	GGTGGAACCATCTGGCTTCA	第4章2-7
Stg008E12 RT-f	CCTTTAATCCCTCACTCTCTCCCTA	第4章2-7
Stg008E12 RT-r	CCAGGAAGAAGAAGGATACTGTTTTTG	第4章2-7
Stg029B01 RT-f	CGACGAACCCCATTCACAA	第4章2-7
Stg029B01 RT-r	ATTTGCAGTGTTTGCCACGTT	第4章2-7
Stl005H07 RT-f	CGACTTCGCAAAGGACGAA	第4章2-7
	CCTCAAGTTGCAGAAAAGGACAT	第4章2-7
Suk018F07 RT-f	GGAGAGACGAGGAGCAAGCA	第4章2-7
Suk018F07 RT-r	ATCCTCATCACTTGTCGCTAGCT	第4章2-7
Sut004C12 RT-f	AACTGATGGGTCGGGTTGAC	第4章2-7
Sut004C12 RT-r	CTCCGAAACCCAGTCCACAT	第4章2-7
Sut014G12 RT-f	GGTGTAACCCCAGCATCATCA	第4章2-7
	CCCATACGACCCCTCACAAC	第4章2-7

別	表	1	(続き	)

プライマー名	配列(5'→3'):制限酵素認識配列(下線),	使用した実験,
	変異導入部位(ゴシック太字)	認識制限酵素,導入変異
SMYEVベクター構築	奥用プライマー	
CF2	AAGACCCAGACTTCCCGATT	第5章3-1-2, 3, 4, 5, 6, 8
vecNR1	CCG <u>CTCGAGACTAGT</u> TCACCAACTTGATTGGCGAC	第5章3-1-2, 5, Xho I, Spe I
vecNF1	CCG <u>CTCGAGGCTAGC</u> TTAATTACCGCTGCAGTTGTAGGGTACA	第5章3-1-2, 5, Xho I, Nhe I
	CAATCGCCCTGGTCAGTAATTCCGGTTGATAGGTGCA	$T \rightarrow A, C \rightarrow G$
CR2	TGGAAGGCTAAGTCGAAGAGA	第5章3-1-2, 3, 4, 5, 6, 8
vecNR3-2	CCG <u>CTCGAGACTAGT</u> CATTGTATTGGGACGCTCC	第5章3-1-3, 5, Xho I, Spe I, G→C
vecNF3-2	CCG <u>CTCGAGGCTAGC</u> TAGGGGTTAAGTTACCATTCTCTC	第5章3-1-3, 4, 5, Xho I, Spe I
vecNR4-1	CCG <u>ACGCGT</u> CTAATCTAGGGCCCAAATGG	第5章3-1-4, 5, Mul I
vecNF4-1	CCG <u>ACGCGT</u> TTAATTACCGCTGCAGTTGTAGG	第5章3-1-4, 5, Mul I
vecNR4-2	CCG <u>CTCGAGACTAGT</u> CATCGAAGTGCACGTAACAA	第5章3-1-4, 5, Xho I, Spe I
SMYEVベクターシ	/ーケンス用プライマー	
Cseq-f1	GCCAATACGGAGTGTTCGAT	第5章3-1-4,5,8
Cseq-r1	TCGGGATCAGATGAGTAGGG	第5章3-1-5,8
Cseq-r2	AACGCCAAGACTAGCAGAGC	第5章3-1-5,8
SMYEVベクターイン	イサート確認用プライマー	
MCS-f	GCGAGCTCTCGACTTGACTT	第5章3-1-8,4-2-1
MCS-r	GCAGCAAGTTCCTCAGGAGT	第5章3-1-8,4-2-1
MCS-nf	TCGAGACCTGGTGAAGCTAAA	第5章3-1-8,4-2-1
MCS-nr	GGCCAGTGATAGGACGGTTA	第5章3-1-8,4-2-1
イチゴ <i>PDS</i> 遺伝子	増幅プライマー	
stPDS10-f2	CCG <u>ACTAGT</u> TGCATACAATAATTCACACCAATG	第5章4-1-1, Nhe I
stPDS10-r	CCG <u>GCTAGC</u> GGTGCTGTTCTATCAGGGAAA	第5章4-1-1, Spe I
stPDS12-f	CCG <u>ACTAGT</u> TTGCCTGTGCACAAAGTTTC	第5章4-1-1, Nhe I
stPDS12-r2	CCG <u>GCTAGC</u> TTGCACCAGCTGAAGAATG	第5章4-1-1, Spe I

LB培地	最終濃度
Bacto-tryptone	1.0%
Bacto-yeast extract	0.5%
NaCl	1.0%
純水で調製し, 1N NaOHでpH 7に調整した後,	オートクレーブ滅菌する.
LB寒大培地	最終濃度
LB培地	
寒大	
純水で調製し、IN NaOHでpH 7に調整した後,	オートクレーフ滅困する.
MS20培地	最終濃度
KNO <sub>3</sub>	1900 mg/l
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650 mg/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170 mg/l
$MnSO_4 \cdot 5H_2O$	22.3 mg/l
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8.6 mg/l
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.025 mg/l
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.025 mg/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2 mg/l
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.25 mg/l
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370 mg/l
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440 mg/l
KI	0.83 mg/l
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27.8 mg/l
EDTA • 2Na	37.3 mg/l
myo-イノシトール	100 mg/l
ニコチン酸	0.5 mg/l
塩酸ピリドキシン	0.5 mg/l
塩酸チアミン	0.1 mg/l
グリシン	2 mg/l
ショ糖	2%
純水で調製し, 1N NaOHでpH 5.2に調整した後	,オートクレーブする.温度が下

がった後、フィルター滅菌したアセトシリンゴンを最終濃度50 µ Mで加える.

X-Ghuc溶液	最終濃度
X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide)	0.5 mg/l
Potassium Ferricyanide	0.5 mM
Potassium Ferrocyanide	0.5 mM
Triton X-100	0.3%
Phosphate Buffer	100 mM
VCL HC LL L	いにに応知してフレック

X-GlucはCyclohexylammonium saltをN,N-dimetylformamideに溶解してストック液とした.

略語一覧	
用語	正式名称
3-GT	Anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase
4CL	4-coumarate-CoA ligase
ABA	Abscisic acid : アブシジン酸
ACC	1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid : 1-アミノシクロプロパンカルボン酸
AFLP	Amplified fragment length polymorphism : 增幅断片長多型
AGI	Arabidopsis Genome Initiative
ANR	Anthocyanidin reductase:アントシアニジン還元酵素
ANS	Anthocyanidin synthase:アントシアニジン合成酵素
BLAST	Basic local alignment search tool
BPB	Bromophenol blue: ブロモフェノールブルー
BTH	Benzothiadiazole:ベンゾチアジアゾール
C4H	Cinnamate-4-hydroxylase:桂皮酸-4-水酸化酵素
CAD	Cinnamyl alcohol dehydrogenase:シンナミルアルコールデヒドロゲナーゼ
CaMV	Cauliflower mosaic virus : カリフラワーモザイクウイルス
CAPS	Cleaved amplified polymorphic sequence
cDNA	Complementary DNA:相補的DNA
CDS	Coding sequence: コーディング領域
CHI	Chalcone isomerase: カルコン異性化酵素
CHS	Chalcone synthase : カルコン合成酵素
COI1	Coronatine insensitive 1
CP	Coat protein : 外被タンパク質
Ct	Threshhold cycle
CTAB	Cetyl trimethyl ammonium bromide:臭化セチルトリメチルアンモニウム
CymMV	Cymbidium mosaic virus : シンビジウムモザイクウイルス
DFR	Dihydroflavanol 4-reductase:ジヒドロフラボノール4-還元酵素
DMSO	Dimethyl sulfoxide : ジメチルスルフォキシド
E value	Expectation value:期待值
EBI	European Bioinformatics Institute
edr1	enhanced disease resistance 1
EIN2	Ethylene insensitive 2
EST	Expressed sequence tag:発現配列タグ
ET	Ethylene:エチレン
F3'H	Flavonoid 3'-hydroxylase:フラボノイド-3'-水酸化酵素
F3H	Flavanone 3-hydroxylase : フラバノン-3-水酸化酵素
FLS	Flavonol synthase:フラボノイド合成酵素
GDR	Genome Database for Rosaceae:バラ科ゲノムデータベース
GO	Gene Ontology
GUS	β-glucuronidase : β-グルクロニダーゼ
Ile	Isoleucine:イソロイシン
ISR	Induced systemic resistance:誘導全身抵抗性
JA	Jasmonic acid:ジャスモン酸
JA-Ile	Jasmonoyl-isoleucine:イソロイシン結合ジャスモン酸

略語一覧(続き)	
用語	正式名称
JAR1	Jasmonate resistant 1
JAZ	Jasmonate ZIM-domain
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LAR	Leucoanthocyanidin reductase
LB	Lysogeny broth:溶原培地
LOWESS	Locally weighted scatterplot smoothing
MeJA	Methyl jasmonate:ジャスモン酸メチル
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NH1	NPR1 homologue 1: NPR1ホモログ1
NPR1	Nonexpresser of pathogenesis-related proteins 1
nr	Non-redundant protein sequences:非重複タンパク質配列
OD	Optical density:光学密度
ORF	Open reading frame:翻訳領域
OsNPR1	Oryza sativa NPR1 : イネNPR1
PAL	Phenylalanine ammonia-lyase : フェニルアラニンアンモニアリアーゼ
PBZ	Probenazole: プロベナゾール
PCR	Polymerase chain reaction:ポリメラーゼ連鎖反応
PDS	Phytoene desaturase:フィトエン不飽和化酵素
PEN2	PENETRATION2
PVX	Potato virus X: ジャガイモXウイルス
QTL	Quantitative trait loci:量的形質遺伝子座
RNAi	RNA interference: RNA干涉
RSV	Rice stripe virus : イネ縞葉枯ウイルス
RT-PCR	Reverce transcription polymerase chain reaction:逆転写ポリメラーゼ連鎖反応
SA	Salicylic acid : サリチル酸
SAR	Systemic acquired resistance:全身獲得抵抗性
SCV	Strawberry crinkle virus:イチゴクリンクルウイルス
SMoV	Strawberry mottle virus:イチゴ斑紋ウイルス
SMYEV	Strawberry mild yellow edge virus:イチゴマイルドイエローエッジウイルス
SVBV	Strawberry vein banding virus:イチゴベインバンディングウイルス
SCF	Skp1/Cul1/F-box protein
TAIR	The Arabidopsis Information Resource
TGB	Triple gene block
TILLING	Targeting Induced Local Lesions IN Genomes
ToMV	Tomato mosaic virus : トマトモザイクウイルス
UTR	Untranslated region:非翻訳領域
VIGS	Virus-induced gene silencing : ウイルス誘導ジーンサイレンシング